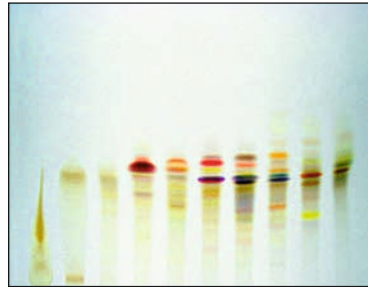
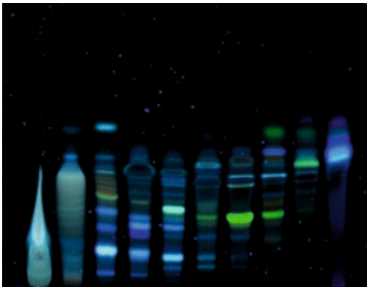


EINFLUSS DER VON *EXOPHIALA DERMATITIDIS* SYNTHETISIERTEN PIGMENTE AUF DAS PHAGOZYTOSEVERHALTEN HUMANER NEUTROPHILER GRANULOZYTEN

- Eine explorative Studie am Durchflusszytometer -

SASKIA VERENA JANU



INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



edition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2012

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2012

© 2012 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer
und der
Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. P. Mayser

**Einfluss der von *Exophiala dermatitidis* synthetisierten
Pigmente auf das Phagozytoseverhalten humaner
neutrophiler Granulozyten**

- Eine explorative Studie am Durchflusszytometer -

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Saskia Verena Janu, geb. Kurz

Tierärztin aus Heidelberg

Gießen 2012

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin der
Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. M. Kramer

Gutachter: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer
Prof. Dr. P. Mayser

Tag der Disputation: 13.11.2012

Für meine Eltern

I Inhaltsverzeichnis

II Abbildungsverzeichnis

III Tabellenverzeichnis

IV Abkürzungsverzeichnis

1	Einleitung und Literaturübersicht	1
1.1	Pilze	1
1.1.1	Schwärzepilze	1
1.1.2	<i>Exophiala dermatitidis</i>	1
1.1.2.1	Vorkommen	2
1.1.2.2	Humanmedizinische Bedeutung	2
1.1.2.3	Veterinärmedizinische Bedeutung	5
1.2	Infektabwehr	7
1.2.1	Mechanismen der unspezifischen Infektabwehr	7
1.2.1.1	Mechanische Faktoren	7
1.2.1.2	Humorale Faktoren	7
1.2.1.3	Zelluläre Faktoren	8
1.2.2	Mechanismen der spezifischen Infektabwehr	10
1.2.2.1	Spezifische humorale Abwehr	11
1.2.2.2	Spezifische zelluläre Abwehr	12
1.2.3	Ablauf der Phagozytose	13
1.3	Pigmente	15
1.3.1	Definition und Funktion	15
1.3.2	Pigmente bei Pilzen	16
1.3.2.1	Melanine	16
1.3.2.2	Indolalkaloide	17
2	Hintergrund und Fragestellung	21

3	Material und Methoden	23
3.1	Herstellung von Rohextrakt und Isolation der Pigmente	23
3.1.1	Zugrundeliegende Referenzstämme von <i>Exophiala dermatitidis</i>	23
3.1.2	Stammhaltung und Kultur der Hefen	25
3.1.3	Rohextraktgewinnung	26
3.1.4	Säulenchromatographie	27
3.1.5	Dünnschichtchromatographie	29
3.1.6	High Performance Liquid Chromatography (HPLC)	32
3.1.6.1	Präparative HPLC	32
3.1.6.2	Analytische HPLC	33
3.2	Phagozytose	34
3.2.1	Verwendete <i>Exophiala</i> - Isolate	34
3.2.2	Anzucht und Kultur	34
3.2.3	Präparation der Pigmente	35
3.2.4	Präparation der Zellen für den Messvorgang	36
3.2.4.1	Markierung der neutrophilen Granulozyten	36
3.2.4.2	Markierung der Hefezellen	36
3.2.5	Versuchsaufbau	37
3.3	Durchflusszytometrie	39
3.3.1	Allgemeines Prinzip	39
3.3.2	Verwendetes Messgerät	40
3.3.2.1	Flüssigkeitssystem	40
3.3.2.2	Komponenten und Funktionen des optischen Systems	41
3.3.2.3	Elektronik	45
3.3.3	Messung am Durchflusszytometer	46
3.3.4	Auswertung	46
3.3.5	Statistische Auswertung	48
4	Ergebnisse	49
4.1	Von den Referenzstämmen zur Pigmentgewinnung	49
4.2	Phagozytoseversuche	52
4.2.1	Markierung der Zellen	52

4.2.2	Auswertungsmodalitäten am Durchflusszytometer	55
4.2.3	Einfluss der DMSO-gelösten Rohextrakte von <i>Exophiala dermatitidis</i> Wildtyp und Mel-3	59
4.2.4	Methanol als Lösungsmittel der Pigmente	63
4.2.5	Einfluss der (Sephadex-) Fraktionen	66
4.2.5.1	<i>Exophiala dermatitidis</i> Wildtyp (ATCC No.34100)	66
4.2.5.2	<i>Exophiala dermatitidis</i> Mel-3 (ATCC No. 44504)	67
4.2.6	Einfluss der dünnschichtchromatographischen Banden.....	73
4.2.7	Einfluss von Pityriazol aus <i>Malassezia furfur</i>	77
4.2.8	Versuche zur Darstellung des Hemmstoffes „Anthrazit“ von Heidrich 2010	78
5	Diskussion	79
6	Zusammenfassung	88
7	Summary	90
8	Literaturverzeichnis	92
9	Danksagung	102
10	Erklärung	103

II Abbildungsverzeichnis

		Seite
Abbildung 1	Schematische Darstellung der im Blut zirkulierenden Zellen	9
Abbildung 2	Ausschnitt des elektromagnetischen Spektrums im sichtbaren Bereich	15
Abbildung 3	Indolgrundkörper	17
Abbildung 4	Physostigmin	18
Abbildung 5	Malassezin	18
Abbildung 6	Pityriacitrin	19
Abbildung 7	Exophialin bzw. 8-Hydroxyexophialin	20
Abbildung 8	Melaninsynthese <i>Exophiala dermatitidis</i>	24
Abbildung 9	Darstellung des R_f -Wertes	30
Abbildung 10	Flüssigkeitssystem des FACSCanto II	41
Abbildung 11	Strahlengang in der Optik	42
Abbildung 12	Die 4-2-2-Konfiguration (ein Octagon, zwei Trigons)	43
Abbildung 13	Lysiertes Vollblut in Dotplotdarstellung (rote Punktwolke: Granulozytengate, 1 : Zelltrümmer; 2 : Monozyten; 3 : Lymphozyten; 4 : Granulozyten)	47
Abbildung 14	Einteilung des Dotplots in vier Quadranten (Q1-Q4)	47
Abbildung 15	Darstellung der sieben Säulenchromatographie-Fraktionen des <i>E.dermatitidis</i> -Wildtyps bei Tageslicht in der DC	50
Abbildung 16	Darstellung der sieben Säulenchromatographie-Fraktionen des <i>E.dermatitidis</i> -Wildtyps bei 366 nm mittels UV-Licht in der DC	50
Abbildung 17	Darstellung der zehn Säulenchromatographie-Fraktionen der <i>E.dermatitidis</i> -Mutante Mel-3 bei Tageslicht in der DC	51

Abbildung 18	Darstellung der zehn Säulenchromatographie-Fractionen der <i>E.dermatitidis</i> -Mutante Mel-3 mittels UV-Licht in der DC	51
Abbildung 19	<i>Exophiala dermatitidis</i> Mel-3 ungefärbt (links) und nach erfolgreicher Anfärbung mit BCECF (rechts)	52
Abbildung 20	Histogramm von lysiertem, ungefärbtem Vollblut (links) und solchem mit APC-Markierung (rechts)	53
Abbildung 21	Darstellung des Schutzes von Melanin vor der Phagozytose: <i>Exophiala dermatitidis</i> Wildtyp (links) mit deutlich weniger Zellen in Q2-1 als Mel-3 (rechts); Inkubationszeit je 20 Minuten	54
Abbildung 22	Ungefärbtes Vollblut (links) und mit Zusatz der Mutante Mel-3 (rechts)	55
Abbildung 23	Ungefärbtes Vollblut bzw. Pilze im unteren linken Quadranten (Q3) (Abszisse: Fluoreszenzkanal BCECF; Ordinate: Fluoreszenzkanal APC)	56
Abbildung 24	Nach erfolgter Markierung befinden sich die CD16 ⁺ -Granulozyten im oberen linken Quadranten (Q1)	56
Abbildung 25	BCECF-gefärbte <i>E. dermatitidis</i> -Zellen (Mel-3) im unteren rechten Quadranten (Q4)	57
Abbildung 26	Nach erfolgter Phagozytose erscheinen die „doppelt positiven“ Granulozyten im oberen rechten Quadranten (Q2)	57
Abbildung 27	Negativkontrolle mit PFA; Granulozyten befinden sich in Q3, da die Bindung des CD16-Antikörpers aufgrund der Quervernetzung der Oberflächenrezeptoren unterbleibt; Adhäsion/Phagozytose ist nicht möglich	58
Abbildung 28	Einfluss des DMSO-Rohextraktes vom <i>E.dermatitidis</i> Wildtyp (RE202) und der Mutante Mel-3 (RE201) auf die Phagozytose (Anteil der Zellen in Q2 [%]); als Kontrolle dienten immer ein Ansatz ohne Rohextrakt, sowie eine DMSO- und Negativkontrolle (PFA) zum Zeitpunkt „60 Minuten“	60

Abbildung 29	Graphische Darstellung der Titrations von Ethanol und Methanol und ihr Vergleich mit den Kontrollen (Zeitpunkt 60 Minuten); zur Veranschaulichung der DMSO-Ansatz nach 60 Minuten	64
Abbildung 30	Einfluss der gepoolten Pigment-Fraktionen F1-F7 von <i>E. dermatitidis</i> Wildtyp auf die Phagozytose (n=8)	66
Abbildung 31	Phagozytose-Kontrollansatz mit Mel-3 (n=7) im Vergleich zu den Ansätzen mit Zugabe der Pigment-Fraktionen Mel-3 F1-F3 und F4-F10 im zeitlichen Verlauf (n=2)	67
Abbildung 32	Ablauf der Phagozytose der Mutante Mel-3 ohne (Kontrollen; n=34) und mit der Zugabe von Methanol (n=16) und den Fraktionen Mel-3 F1, F2 oder F3 (n=14)	69
Abbildung 33	Einfluss der Fraktion 2 der Mutante Mel-3 auf die Phagozytose im zeitlichen Verlauf (n=12)	70
Abbildung 34	Darstellung des zeitlichen Verlaufs und Einflusses der Fraktionen Mel-3 F1-F3 (B-D) im Vergleich zur Kontrolle (A); linksbündig jeweils die korrespondierenden Dotplotdarstellungen zum Zeitpunkt 0 Minuten, rechtsbündig nach 60-minütiger Inkubation	71
Abbildung 35	Darstellung der Phagozytose nach 0,10 und 60 Minuten A : Kontrollansatz; B : Zusatz F2 Mel-3; C : Negativkontrolle mit PFA	72
Abbildung 36	Unterteilung der Sephadex-Fraktion F2 der Mutante Mel-3 in fünf einzelne Banden (links bei Tageslicht, rechts bei 366 nm)	73
Abbildung 37	Vergleich des Einflusses der fünf verschiedenen DC-Banden (B1-B5) der Sephadex-Fraktion F2 (Mel-3) auf die Phagozytose (n=12)	74
Abbildung 38	Dotplotdarstellungen der Einwirkung der Banden B1-B5 (B-F) Mel-3 nach 0 (linksbündig) und 60 Minuten (rechtsbündig) im Vergleich mit der Kontrolle (A)	75/76

Abbildung 39	Darstellung von Pityriazol aus <i>Malassezia furfur</i>	77
Abbildung 40	Untersuchungen zum Einfluss des Pityriazols aus <i>Malassezia furfur</i> auf die Phagozytose von <i>E.dermatitidis</i> -Mel-3 durch neutrophile Granulozyten (n=4)	78

III Tabellenverzeichnis

	Seite
Tabelle 1	Referenzstämme der Studie 23
Tabelle 2	Inhaltsstoffe zur Herstellung von 300 ml 1b-Agar 25
Tabelle 3	Anzahl der Fraktionen beider Stämme und deren Aussehen nach Säulenchromatographie 28
Tabelle 4	Abfolge und Einstellungen beim Fotografieren mit dem Camag Reprostar 3, nachfolgend die Fotografien 30
Tabelle 5	Inhaltsstoffe des Flüssigmediums 34
Tabelle 6	Optische Filter der 4-2-2-Konfiguration 43
Tabelle 7 a	Gültige Messungen (n), Mittelwert (Mw) und Standardabweichungen (SD) der Kontrollen und mit jeweiligem Zusatz von Rohextrakt Mel-3 (RE201) bzw. Wildtyp (RE202) 61
Tabelle 7 b	p-Werte der Ansätze mit zugegebenem Rohextrakt Mel-3 (RE201) und Wildtyp (RE202) im Vergleich mit der Kontrolle und zueinander 61
Tabelle 8	Vergleich der Kontrollen mit dem DMSO-Ansatz nach 60 Minuten 62
Tabelle 9	Vergleich der beiden Kontrollansätze zum Zeitpunkt 60 Minuten 62
Tabelle 10	Gegenüberstellung von Methanol und Ethanol mit Bezug auf die Kontrollen; untere Tabelle: daraus resultierende p-Werte 63/64
Tabelle 11	Vergleich von Mel-3 F1-F3 und F4-F10 mit der Kontrolle und miteinander anhand der p-Werte 68
Tabelle 12	Signifikanzen im zeitlichen Verlauf von 60 Minuten 69
Tabelle 13	Veränderungen durch Zugabe der Banden B1-B5 im zeitlichen Verlauf im Vergleich zum Kontrollansatz 74

IV Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µl	mikroliter
%	Prozent
APC	Allophycocyanin
Aqua dest.	Aqua destillata
ATCC	American Type Culture Collection
BCECF-AM	2',7'-Bis-(carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein-penta-acetoxymethylester
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures Netherlands
CD	Cluster of differentiation
CFU	colony forming units
DC	Dünnschichtchromatographie
d.h.	das heißt
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg
DMSO	Dimethylsulfoxid
FeLV	Felines Leukämievirus
FIP	Feline infektiöse Peritonitis
FIV	Felines Immundefizienz Virus
FMLP	Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin
FL-1	Fluoreszenz-1, Emmisionsmaximum 525 nm
FSC	Forward Light Scatter = Vorwärtsstreuung
g	Gramm
h	Stunde
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
I.E.	Internationale Einheiten
IL	Interleukin

Abkürzungsverzeichnis

IR	Infrarot Licht
iVz.	im Vergleich zu
lat.	Lateinisch
LDH	Laktatdehydrogenase
Mel-3	Melaninmangelmutante 3 von <i>E. dermatitidis</i>
MHC	Major Histocompatibility Complex
min	Minute(n)
ml	Milliliter
MOPS	N-Morpholino-Propansulfonsäure
MW	Molekulargewicht (molecular weight)
Mw	arithmetischer Mittelwert
NaCl	Natriumchlorid
n	gültige Messungen
nm	Nanometer
No.	Nummer
P	Patientennummerabkürzung Stammsammlung Prof. Haase
PAF	Platelet activating factor (Plättchenaktivierender Faktor)
PBS	Phosphate buffered saline
PFA	Paraformaldehyd
PKS	Polyketid-Synthase
R _f -Wert	Verhältnis von Substanzlaufstrecke zur Laufstrecke des Fließmittels
ROS	reactive oxygen species
syn.	synonym
SD	Standardabweichung
SSC	Sideward Light Scatter = Seitwärtstreuung
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolettes Licht
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem

1 Einleitung und Literaturübersicht

1.1 Pilze

In der biologischen Klassifikation bilden die eukaryotischen Pilze neben den Pflanzen und Tieren ein eigenständiges Reich. Die Abgrenzung zu den Pflanzen basiert auf dem Fehlen von Chlorophyll und damit einer heterotrophen Lebensweise. Im Gegensatz zu Tieren weisen Pilzzellen meist chitinhaltige Zellwände auf. Höhere Pilze, sogenannte Eumyzeten, werden entsprechend ihrer sexuellen Sporenbildung in fünf Gruppen eingeteilt: den Zygomyzeten (Jochpilze), Ascomyzeten (Schlauchpilze), Basidiomyzeten (Ständerpilze), Chytridiomycota (Töpfchenpilze) und Glomeromycota (arbuskuläre Mykorrhizapilze) (Schwantes 1996).

1.1.1 Schwärzepilze

Pilze, bei denen das sexuelle Stadium fehlt (Fungi imperfecti) oder nicht nachgewiesen werden konnte, werden den Deuteromyzeten zugeordnet (de Hoog et al. 2000). Hierzu zählen nahezu alle humanpathogenen Pilze, wie auch die meisten schwarzen Hefen. Dabei bestehen aufgrund der Septumart, des Aufbaus der Zellwand und der molekularen Phylogenese teleomorphe Beziehungen zu den Asco- und den Basidiomyzeten. Eine weitere Unterteilung der Deuteromyzeten kann anhand der Konidiogenese in Coelomyzeten (konidiogene Zellen werden an einer bestimmten Stelle gebildet) und Hyphomyzeten (zufällige Verteilung) vorgenommen werden. Den Hyphomyzeten wiederum werden Pilze zugeordnet, die Melanin selbst bilden oder aber in der Zellwand des Myzels oder der Konidien einlagern. Man bezeichnet sie als Dematiaceae (Schwärzepilze). Schwärzepilze zeichnen sich durch polymorphes Wachstum aus, d.h. sie sind fähig, als reine Hefen, aber auch unter Konidienausbildung zu wachsen (de Hoog et al. 1994).

1.1.2 *Exophiala dermatitidis*

Die Gattung *Exophiala* wird der Familie Herpotrichiellaceae, der Ordnung Chaetothyriales und der Klasse Euascomyzeten zugeordnet. Sie gehört zur Form der Ascomyzeten. Makroskopisch fällt sie durch dunkel pigmentierte Kolonien auf, was neben Annelidenbildung ein Charakteristikum für diesen Schwärzepilz darstellt. Diese Zuordnung wird durch die Fähigkeit des dimorphen Wachstums von *Exophiala* untermauert. So können in einer Kultur beide Wachstumsformen nebeneinander vorkommen (Szaniszlo et al. 1993). Diese Tatsache verdeutlicht die Schwierigkeit der taxonomischen Zuordnung von *Exophiala dermatitidis*. Von

1937 an wurde der Typstamm neun Namensänderungen unterzogen, bis er 1977 der Gattung *Exophiala* zugeordnet wurde. Dabei beriefen sich die Experten auf deren annelidische Konidiogenese (de Hoog and Hermanides-Nijhof 1977).

1.1.2.1 Vorkommen

Der Ursprung dieser Spezies wird neueren Untersuchungen zufolge im tropischen Regenwald vermutet (Sudhadham et al. 2008). Dafür scheinen unter anderem die Oligotrophie, die ausgeprägte Wärme- und Säuretoleranz, wie auch die Melaninsynthese in den Zellwänden von *Exophiala dermatitidis* zu sprechen. Als Vektoren kommen verschiedene Tiere in Betracht, wie z.B. fruchtefressende Vögel. Über den Verzehr von kontaminierten Beeren beispielsweise könnte der Keim seine Verbreitung in die Zivilisation bewerkstelligt haben. Bereits 1980 wurde in den USA ein ubiquitäres Vorkommen von *Exophiala dermatitidis* anhand von Boden- und Pflanzenproben postuliert (Dixon et al. 1980). Dabei wurden Hamster und Mäuse infiziert und ähnliche Symptome wie beim Menschen beobachtet. Hinsichtlich der Morphologie, der Gelatinereaktion und des Überlebens der Labortiere im Tierversuch unterschieden sich die Umweltisolate nicht. In Boden-, Wand- und Luftproben eines nordamerikanischen Futterunternehmens konnte ebenfalls neben anderen Keimen *Exophiala dermatitidis* detektiert werden (Espinell-Ingroff et al. 1982).

Ferner scheinen Luftbefeuchter ebenso wie Bade- und Abwasser in herkömmlichen Haushalten ein bedeutendes Reservoir für *Exophiala*-Spezies in Japan zu sein (Nishimura et al. 1987). Hohe Prävalenzen konnten auch in europäischen Dampfbädern verzeichnet werden, was auf die hohe Wachstumstemperatur - bis zu 42°C - dieser schwarzen Hefe und die Produktion von extrazellulären Polysacchariden zurückzuführen ist (Matos et al. 2002). Im menschlichen Darmtrakt kann *Exophiala dermatitidis* subklinisch persistieren (de Hoog et al. 2005).

1.1.2.2 Humanmedizinische Bedeutung

Exophiala dermatitidis stellt einen fakultativ pathogenen Pilz dar. Neben seinem saprophytären Habitat in Boden und organischem Material kann er auch für schwere systemische Erkrankungen bei Mensch und Tier verantwortlich gemacht werden.

Bei einer Studie zur mykologischen Flora der menschlichen Haut wurden 133 Individuen an Hand von Abstrichen beprobt. Es konnten 143 Pilze von 13 verschiedenen Gattungen und 39 Spezies nachgewiesen werden. 85 % der isolierten Pilze waren Hefen, dabei handelte es sich bei 75 % um Keime mit pathogenem Potenzial (Mok and Baretto da Silva 1984). Diese

Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass auch der dabei isolierte Schwärzepilz *Exophiala dermatitidis* zur transienten Hautflora gehört. Jedoch tritt er beim Menschen ebenfalls klinisch als Krankheitserreger in Erscheinung. So unterscheidet man drei *Exophiala dermatitidis*- Manifestationsformen: die **Chromoblastomykose**, die **Phaeohyphomykose** und das tiefe **eumykotische Myzetom** (Garcia-Martos et al. 2002; Brandt and Warnock 2003).

Die **Chromoblastomykose** stellt eine subkutane, oft traumatisch erworbene Infektion distaler Gliedmaßen dar und wird auch als Dermatitis verrucosa bezeichnet. An der Inokulationsstelle entsteht nach penetrierenden Verletzungen ein kleiner Knoten, der sich zu einer verrukösen Plaque entwickelt. Meist ist die Infektion auf die Epidermis und das Korium begrenzt. Klinisch präsentiert sie sich mit verrukösen Veränderungen der Haut, die zum Teil ulzerieren können. Es bilden sich zunächst warzenartige, dunkel pigmentierte, verhärtete Knötchen, die im weiteren Verlauf der Erkrankung zu verkrusteten, schuppigen Warzen generieren. Oft wird bei der chronischen Verlaufsform eine blumenkohlartige Wucherung oder tumorartige Verdickung des betroffenen Hautareals beobachtet. Durch Einbruch in regionäre Lymphbahnen kann es zur Disseminierung des Erregers kommen. Neben *Exophiala*-Spezies rufen auch unter anderem *Fonsecaea pedrosoi*, *F.compacta*, *Cladosporium carrionii*, *Phialophora verrucosa* und *Rhinocladiella aquaspersa* eine Chromoblastomykose hervor (Meves 2006). Diese Erkrankung wird weltweit beobachtet.

Sie tritt gelegentlich in Asien auf (Naka et al. 1986) und gilt in Europa als seltene Erkrankung (Mayser et al. 1996). Peña-Penabad et al. berichten 2003 über den ersten europäischen Fall einer durch *Exophiala jeanselmei* hervorgerufenen Chromoblastomykose bei einem nierentransplantierten Spanier. Ein Fallbericht aus England beschreibt *Exophiala spinifera* als Auslöser einer Chromoblastomykose (Tomson et al. 2006). In Tunesien und Japan traten Fälle auf, bei denen verruköse Hautveränderungen im Gesäßbereich als Chromoblastomykose diagnostiziert wurden (Ezzine-Sebaï et al. 2005, Kondo et al. 2005). Dabei scheint die Inzidenz auf beide Geschlechter annähernd gleich verteilt zu sein, wobei die Infektion hauptsächlich in der Oberschenkelregion lokalisiert ist (Kondo et al. 2005).

Das gemeinsame spezifische Merkmal einer **Phaeohyphomykose** sind die dunkel gefärbten Myzelien. Man unterscheidet zerebrale Phaeohyphomykosen, bei denen es sich um intrazerebrale Abszesse handelt, die sich im Verlauf der Infektion vergrößern und schließlich zum Tode führen können, von subkutanen und disseminierten Phaeohyphomykosen. Meist wird erstere Form von neurotrophen Schwärzepilzen, wie *Exophiala dermatitidis* oder *Cladophialophora bantiana* hervorgerufen (Darai et al. 2003). Im Gegensatz zu anderen Mykosen scheint das T-Zellsystem bei der Beherrschung dieser Infektionsform nur eine

untergeordnete Rolle zu spielen. Das heißt, dass diese Erkrankung in erster Linie bei Personen ohne Grunderkrankung auftritt, da der Immunstatus des Wirtes nur im seltensten Fall im Zusammenhang mit der Erkrankung steht (Darai et al. 2003).

Sharma et al. beschreiben 2002 verschiedene Fälle von subkutanen Phaeohyphomykosen in Indien, bei denen unterschiedliche Komplikationen auftraten. *Exophiala*-Pilze erweisen sich als Erreger mit eher fatalen Krankheitsverläufen. In Korea sind bis 2005 laut Suh sieben Fälle einer subkutanen Phaeohyphomykose bekannt geworden. Davon betroffen waren vier männliche und drei weibliche Personen im Alter von neun bis 84 Jahren. Antonucci et al. (2008) sehen eine Assoziation zwischen einer rezidivierenden Phaeohyphomykose durch *Exophiala spec.* mit der Entwicklung eines squamösen Karzinoms. In der Türkei und in China verlief eine systemische Phaeohyphomykose für zwei pädiatrische Patienten trotz Therapieversuch tödlich (Alabaz et al. 2009; Chang et al. 2009). In beiden Fällen wurde *Exophiala dermatitidis* als auslösendes Agens isoliert, es handelte sich um immunkompetente Kinder. Oztas et al. (2009) beschreiben einen Fall einer 24-jährigen Frau, bei der der Verlauf der Phaeohyphomykose einer sklerosierenden Cholangitis ähnelt. Über eine selten vorkommende Phaeohyphomykose des Gesichtes berichten Tokuhisa et al. 2010 bei einer in der Fischindustrie beschäftigten japanischen Frau.

Um eine chronisch-granulomatöse Infektionsform der subkutanen Mykosen handelt es sich beim **eumykotischen Myzetom** (synonym: Madurafuß, Maduramykose), das vor allem in tropischen Regionen verbreitet ist (Meves 2006). Typisch ist eine lokal progressive, destruierende Infektion der Haut, Subkutis, Muskulatur und Knochen als Folge einer Verletzung mit nachfolgender Besiedlung durch Pilze. Klinisch sind meist Fuß, seltener Hand, Thorax oder Kopfhaut betroffen. Die Erkrankung beginnt einseitig mit einer schmerzlosen Papel. Nach Ausbreitung auf die Subkutis schwillt das Gewebe an, ulzeriert und degeneriert eitrig. Das purulente Material enthält Sklerotien (Drusen). Diese Form der Erkrankung kann tief in das Gewebe vordringen und sogar Knochenkavernen verursachen. Oft bleibt am Ende nur noch die Amputation der betroffenen Gliedmaße (Meves 2006). Auch Gattungen von *Madurella*, *Candida* sowie *Streptomyces*-Bakterien können Myzetome hervorrufen.

Exophiala spp. werden von Zeng et al. (2007) als klinisch relevante Erreger für Myzetome in den USA verantwortlich gemacht. In Indien wurde ein 30-jähriger Mann vorstellig, dessen linker Fuß eine massive Schwellung mit austretendem Eiter zeigte. Ätiologisch wurde eine *Exophiala*-Infektion festgestellt (Gabhane et al. 2008). Ein saudischer Mann wurde erfolgreich mit Antimykotika und einer chirurgischen Exzision eines Pilzherdes durch *Exophiala jeanselmei* am Fuß therapiert (Al-Tawiq and Amr 2009). In einem anderen Fallbericht konnte dieser Pilz als Erreger eines Myzetoms am Fuß eines thailändischen

Mannes isoliert werden (Badali et al. 2009). Des Weiteren beschreiben Galor et al. 2009 ein *Exophiala*-assoziiertes subkonjunktivales Myzetom bei einem 76-jährigen Mann, der zuvor eine lokale Kortikosteroidinjektion erhielt (Galor et al. 2009).

Fatalerweise können alle drei Formen zu Systemmykosen führen. Als charakteristisch für generalisierte *Exophiala dermatitidis*-Infektionen gilt der ausgeprägte Neurotropismus (Brandt and Warnock 2003; Li et al. 2010). Prädisponierende Faktoren sind feuchtwarme Regionen, wie sie vor allem den asiatischen Raum dominieren. Dabei erfolgt die Infektion mit *Exophiala* meist durch tiefe Inokulation des Keimes via Traumata der Fußsohle beim Barfuß laufen. Gehäuft tritt die Erkrankung in Ostasien auf, oft werden selbst bei immunkompetenten Menschen generalisierte Infektionen beobachtet (Chang et al. 2000; Chakrabarti 2007). Daher wird eine genetische Prädisposition nicht ausgeschlossen.

Seit längerem bekannt ist die Tatsache, dass *Exophiala dermatitidis* bei Patienten mit zystischer Fibrose aus dem Sputum isoliert werden konnte (Kusenbach et al. 1992). Auch konnte bei einem betroffenen Kind ein erhöhter Antikörperspiegel gegen *Exophiala dermatitidis* konstatiert werden. Das Bronchialgewebe solcher Patienten zeichnet sich durch einen erhöhten Chloridgehalt aus, der aus einem gestörten Elektrolyttransport aufgrund der Erkrankung resultiert. Dies wird von *Exophiala* jedoch sehr gut toleriert (de Hoog and Haase 1993).

1.1.2.3 Veterinärmedizinische Bedeutung

Bereits 1979 konnte *Exophiala* (syn. *Wangiella*) in Brasilien bei verschiedenen Fledermausarten isoliert werden, ohne dass deren Organe makroskopisch verändert erschienen (Reiss and Mok 1979). Außerdem zeigte eine weitere Studie, dass hinsichtlich Antigenen und –sera keine Kreuzreaktivität zwischen den Fledermausisolaten und denen von Menschen bestanden (Mok and Luizão 1981). Grund dafür wurde in der exakten Adaption des Keimes an seinen jeweiligen Wirt gesehen. Bei fruchtfressenden Fledermäusen (*Eidolon helvum*) in Nigeria gelang der Nachweis von *Exophiala dermatitidis* aus der Leber (Mutotoe-Okafor and Gugnani 1993). Nach intravenöser Applikation der Isolate an Labormäuse zeigte sich Neurotropismus.

Bei Katzen treten *Exophiala*-Spezies als Auslöser von Phaeohyphomykosen klinisch in Erscheinung, so z. B. bei zwei Hauskatzen in Australien (Kettlewell et al. 1989). In Nordamerika stellte sich bei Untersuchungen der nasalen Höhlen von Hunden und Katzen heraus, dass auch *Exophiala*-Arten - neben eher klassischen Erregern wie *Aspergillus fumigatus* und *Cryptococcus neoformans* - durchaus Pilzinfektionen in diesem Bereich

hervorrufen können (Wolf 1992). Kano et al. gelang im Jahr 2000 in Japan erstmals die Isolation von *Exophiala dermatitidis* bei einem Hund. Das Tier litt an einem malignen Lymphom, und es konnten 10-15 schwarze, subkutane Knötchen an der rechten Halsseite festgestellt werden. Über eine Nukleotidsequenzanalyse eines Biopats konnten 99% Übereinstimmung mit dem Referenzstamm ermittelt werden (Kano et al. 2000). Aus North Carolina wurde 2000 zum ersten Mal über eine systemische Infektion mit *Exophiala jeanselmi* bei einer 14-jährigen Kurzhaarkatze berichtet, die aufgrund massiv veränderter Organsilhouetten im Ultraschall und Verschlechterung des Allgemeinbefindens mit neurologischen Symptomen euthanasiert werden musste (Helms and McLeod 2000).

In Japan wurde bei einer achtjährigen domestizierten Katze eine feline digitale Phaeohyphomycose an der linken Pfote diagnostiziert. Klinisch zeigte sich ein 1 cm großes, schwarzes Knötchen im Krallenbett der zweiten Phalanx des Tieres, das durch Exzision rezidivfrei entfernt wurde (Maeda et al. 2008). Im Vorfeld konnten Infektionskrankheiten wie FIV und FeLV ausgeschlossen werden. Es wurde eine aplastische Anämie und Hyperglobulinämie festgestellt. Der Verdacht auf eine FIP-Infektion konnte nicht bestätigt werden.

1.2 Infektabwehr

Ein Makroorganismus zeigt gegenüber Mikroorganismen Abwehrleistungen, die in der spezifischen, erworbenen Immunität und in der unspezifischen, angeborenen Resistenz zusammengefasst werden (Kayser et al. 1998).

1.2.1 Mechanismen der unspezifischen Infektabwehr

Die unspezifischen Abwehrmechanismen sind in der Lage, bereits beim ersten Kontakt Krankheitserreger oder Fremdstoffe auszuschalten. Diese Abwehrmaßnahmen sind gegen alle potentiell schädigenden Agenzien mit praktisch gleicher Intensität wirksam, d.h. sie sind nicht zielgerichtet (Thews et al. 1999).

1.2.1.1 Mechanische Faktoren

Neben dem anatomischen Aufbau der Haut und der Schleimhaut verhindert auch die Schleimsekretion der Mukosa zunächst mechanisch das Eindringen von Krankheitserregern. Im tiefen Respirationstrakt sorgt die Ziliarbewegung des Flimmerepithels für einen raschen rachenwärts gerichteten Abtransport von Fremdstoffen. Durch peristaltische Bewegungen des Darmes und durch einen kontinuierlichen Harnstrom im Urogenitaltrakt werden potentielle Pathogene aus dem Körper ausgeschieden (Thews et al. 1999).

1.2.1.2 Humorale Faktoren

Sie beinhalten die mikrobizide Wirkung des Säureschutzmantels der Haut, der Milchsäure von Schweißdrüsen, der Salzsäure des Magens und von ungesättigten Fettsäuren der Talgdrüsen. Auch das Enzym Lysozym, das in Körpersekreten vorkommt, sowie die alternative Aktivierung des Komplementsystems gehören zu den unspezifischen Abwehrmechanismen.

Das Komplementsystem (C-System) ist ein Verband von in Leber und Makrophagen synthetisierten Plasmaproteinen und zellulären Rezeptoren. Es stellt ein wichtiges Entzündungsmediatorensystem dar. Seine Aufgaben umfassen die Opsonisierung von infektiösen Keimen und anderen Fremdstoffen, die Förderung der Löslichkeit und des Transports von Immunkomplexen sowie deren Abbau, und die Regulation der Immunantwort durch Einflussnahme auf Lymphozyten (Kayser et al. 1998). Der klassische Aktivierungsweg wird durch Antigen-Antikörper-Komplexe (IgG, IgM) und C1-Bindung ausgelöst, der

alternative Aktivierungsweg durch Bestandteile mikrobieller Erreger (Bakterien, Viren, Pilze oder Protozoen) und IgA- oder IgE-Antikörper. Durch gebundene Komplementfaktoren werden die Bindung an phagozytierende Zellen, die Aktivierung von Entzündungszellen, die Chemotaxis, die Freisetzung von Entzündungsmediatoren, die direkte bakterizide Wirkung sowie die Zelllyse verbessert (Thews et al. 1999).

Des Weiteren sind Akute-Phase-Proteine (C-reaktives Protein, Haptoglobin, Serumamyloid A, Fibrinogen, Transferrin) wie auch das Fibronektin, das als unspezifisches Opsonin fungiert, effektive Abwehrmechanismen. Die speziesspezifischen Interferone sind hochaktive, körpereigene Proteine mit einem breiten Wirkungsspektrum. Ihre Bildung durch eukaryotische Zellen wird vor allem von Viren, aber auch Bakterien, bakteriellen Produkten, Nukleinsäuren, Pilzen oder Protozoen induziert. Leukozyten und Makrophagen bilden hauptsächlich α -Interferone, Fibroblasten vor allem β -Interferon und T-Lymphozyten nach Antigenkontakt γ -Interferon (Thews et al. 1999).

1.2.1.3 Zelluläre Faktoren

Hierzu zählen die Normalflora von Haut und Schleimhäuten, natürliche Killerzellen und professionelle Phagozyten. Die natürlichen Killerzellen zählen zu den sogenannten Null-Zellen. Es sind große granulierte Lymphozyten, die reichlich saure Hydrolasen enthalten und deren Abwehrfunktion eng an die Produktion und Wirkung von Interferonen gebunden sind. Ihre größte Bedeutung liegt in der unspezifischen Zerstörung von Tumorzellen und virusinfizierten Zellen. Obwohl sie gemeinsame Vorläuferzellen mit den Lymphozyten im Knochenmark besitzen, weisen Null-Zellen keine für T- oder B-Lymphozyten charakteristische Oberflächenmerkmale (antigenspezifische Rezeptoren) auf (Kayser et al. 1998).

Die Phagozytose wird durch die polymorphkernigen, neutrophilen und eosinophilen Granulozyten, die man als Mikrophagen bezeichnet, sowie durch Monozyten bzw. Makrophagen bewerkstelligt. Letztere werden zum mononukleären Phagozytensystem (MPS) gerechnet. Sie sind nicht nur die phagozytoseaktivsten Zellen, sondern sie beteiligen sich auch an spezifischen Abwehrprozessen und synthetisieren einige Komplementfaktoren, Interleukine und α -Interferon. Die Gesamtheit der Mikrophagen eines erwachsenen Menschen beträgt ungefähr $2,5 \times 10^{12}$. Nur 5% davon befinden sich im Blut. Die Lebensdauer der Granulozyten beträgt zwei bis drei Tage. Sie weisen im Blut eine Halbwertszeit von nur wenigen Stunden auf (6-7 h) (Thews et al. 1999). Polymorphkernige Granulozyten entstehen aus der myeloischen Reihe im Knochenmark und machen 60-70% der Blutleukozyten aus.

Die Unterteilung in neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten (**Abbildung 1**) erfolgt anhand ihrer zytologischen Anfärbbarkeit (Giemsa, Pappenheim).

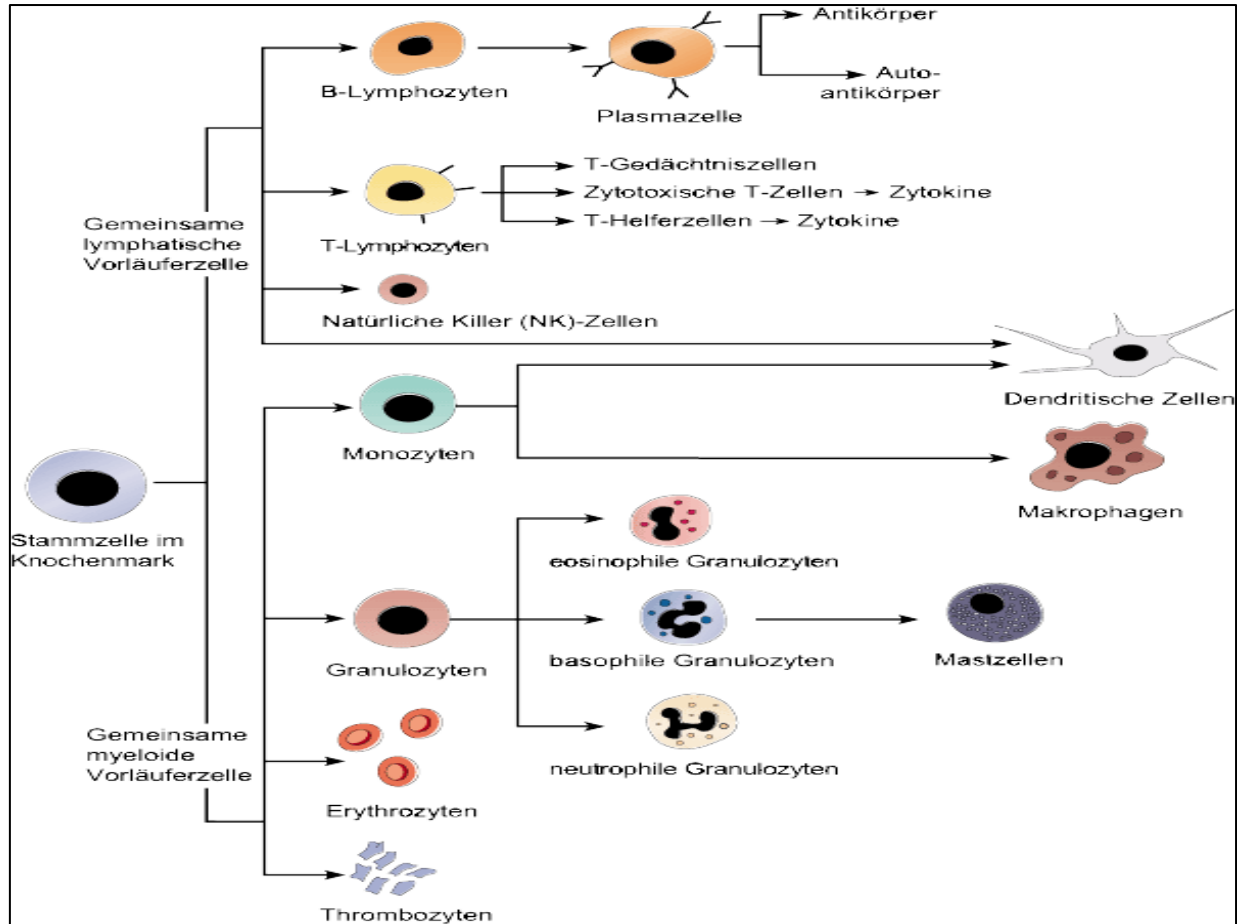


Abbildung 1: Schematische Darstellung der im Blut zirkulierenden Zellen (Quelle: DKFZ, Heidelberg)

Im Entzündungsgebiet tritt eine lokale Verlangsamung des Blutstroms auf, wodurch Granulozyten vermehrt in den Randstrom gedrängt werden und damit in Kontakt mit dem Endothel kommen. Als Folge entzündlicher Reize werden auf der Endotheloberfläche vermehrt Adhäsionsmoleküle exprimiert, die mit Membranproteinen der Leukozyten reagieren und für diese als Leit- und Erkennungsstrukturen dienen. Diese Adhäsionsmoleküle gehören den Selektinen, Integrinen und Adhäsinen der Immunglobulin-Superfamilie an (Thews et al. 1999). Granulozyten sind amöboid beweglich und zur chemotaktischen Migration bzw. Diapedese fähig. Darunter versteht man die gerichtete Bewegung entlang eines Konzentrationsgradienten auf die Quelle chemotaktischer Substanzen hin (Kayser et al. 1998). Diese Substanzen sind vor allem die aktivierten

Komplementfaktoren C3a und C5a, der Plättchenaktivierende Faktor, das bakterielle FMLP sowie einige Zytokine (Thews et al. 1999).

Granulozyten enthalten drei verschiedene Arten von Granula. Die primären oder azurophilen Granula sind Lysosomen, die Myeloperoxidase, Lysozym und kationische Peptide enthalten. Die sekundären oder spezifischen Granula enthalten Laktoferrin, Lysozym und ein Vitamin B12-bindendes Protein. Die dritte Art Granula ist den Lysosomen ähnlich und enthält Hydrolasen. Diese Granulaenzyme ermöglichen das Vordringen im Gewebe zu den eingedrungenen Erregern. Neutrophile Granulozyten stellen mit über 90% den größten Anteil aller im Blut zirkulierenden Granulozyten dar. Sie sind bedeutsam für die Phagozytose von opsonisierten Mikroorganismen, virusinfizierten Zellen, Tumorzellen und anderen körperfremden Antigenen. Mit Hilfe des oxidativen Metabolismus (Oxidative Burst) tragen sie maßgeblich zur Abtötung bzw. Inaktivierung von Mikroorganismen bei. Sie spielen eine entscheidende Rolle bei der akuten nichtinfektiösen und der bakteriellen Entzündung und nehmen eine zentrale Position im Immunsystem bei der Abwehr von Mikroorganismen ein. Der relative Anteil der eosinophilen Granulozyten liegt im zirkulierenden Blut bei 2-5%. Deutlich erhöhte Werte beobachtet man bei Infektionen mit Würmern oder anderen Parasiten, wie auch bei Allergien, die IgE-vermittelt sind (Überempfindlichkeitsreaktionen vom Sofort- und verzögerten Typ). Basophile Granulozyten sind an IgE-vermittelten Allergien vom Soforttyp durch Degranulation und damit Freisetzung von Histamin und PAF beteiligt. Ihr prozentualer Anteil ist mit bis zu 1% normalerweise gering (Kayser et al. 1998).

1.2.2 Mechanismen der spezifischen Infektabwehr

Das spezifische Abwehrsystem ist eine Funktionseinheit, in der Lymphozyten die zentrale Rolle spielen. Diese Zellen werden in den primär-lymphatischen Organen wie Thymus und Knochenmark geprägt und besiedeln anschließend die sekundär-lymphatischen Organe wie Milz, Lymphknoten, Tonsillen, Mukosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe. Neben B- und T-Lymphozyten gehören die antigenpräsentierenden Zellen zu den spezifischen Abwehrzellen. Hierzu zählen Makrophagen, die dendritischen Zellen der sekundär-lymphatischen Organe, die Langerhans-Zellen der Haut und präsentierende B-Lymphozyten. Nach Aufnahme von Fremdproteinen erfolgt deren Zerlegung in Peptidfragmente mit anschließender Präsentation mittels MHC-II-Molekülen auf ihrer Zelloberfläche an antigensensitive T-Helferzellen (Thews et al. 1999).

1.2.2.1 Spezifische humorale Abwehr

Die spezifische humorale Abwehr wird durch einen Antigenkontakt ausgelöst und durch B-Lymphozyten vermittelt. Aus der hämatopoetischen Stammzelle des Knochenmarks entstehen zunächst lymphoide Stammzellen. Zu B-Lymphozyten-Vorläuferzellen reifen die Zellen im menschlichen Organismus im Knochenmark (bone marrow), bei Vögeln in der *Bursa fabricii*, bei Wiederkäuern in den Peyerschen Platten des Ileums und bei Kaninchen im Caecum. Hier erfahren die Zellen eine Prägung in Form von antigenspezifischen Rezeptoren. Sie verlassen die B-Zell-Reifungsorgane als B-Lymphozyten und sind von nun an immunologisch kompetent. Hämato- und lymphogen gelangen sie in Milz und Lymphknoten und siedeln sich dort bevorzugt in den sogenannten Keimzentren der Lymphfollikel an. Hat ein ausdifferenzierter B-Lymphozyt mit einem extrazellulären Antigen Kontakt, entstehen binnen fünf bis sieben Tagen Antikörper. Diese sind streng spezifische, den Epitopen des Antigens komplementäre Reaktionsprodukte (*Schlüssel-Schloß-Prinzip*) und repräsentieren vor allem die Gruppe der γ -Globuline (Thews et al. 1999). Als antigenspezifische Rezeptoren tragen B-Lymphozyten Immunglobuline auf ihrer Oberfläche. Ein erster Kontakt mit dem passenden Antigen führt unter dem Einfluss der Interleukine IL-2, IL-4 und IL-5 zur selektiven Proliferation eines Zellklons. Unter Kontrolle der Interleukine IL-2 und IL-6 wird die Differenzierung zu Plasmazellen angeregt, die wiederum eine Vielzahl von identischen Antikörpermolekülen derselben Spezifität synthetisieren und sezernieren, allen voran IgM. Neben den Plasmazellen entstehen bei Erstkontakt mit einem Antigen auch langlebige B-Gedächtniszellen. Sie erkennen bei erneuter Exposition auch nach Jahren das betreffende Antigen wieder und sind für den „Booster-Effekt“ verantwortlich. Antikörper reagieren mit den Determinanten des jeweiligen Antigens und es entsteht ein Antigen-Antikörper-Komplex. Bei dieser Reaktion kommt es zu einer Konformationsänderung des Antikörpers, wodurch eine Interaktion des Fc-Stücks mit Komplementfaktoren ermöglicht wird. Das Antigen wird neutralisiert. Antigen-Antikörper-Reaktionen können eine Präzipitation (Antigen liegt gelöst vor), Agglutination (Verklumpung durch Brückenbildung) und Zytolyse (Aktivierung von Komplement) zur Folge haben. Des Weiteren löst diese Reaktion die Opsonisierung und Immobilisation von beweglichen Keimen aus (Thews et al. 1999).

1.2.2.2 Spezifische zelluläre Abwehr

Eine zweite Lymphozytenpopulation, die ihren Ursprung ebenfalls in den Stammzellen des Knochenmarks hat, erhält ihre immunologische Prägung im Thymus. Die T-Lymphozyten besitzen an ihrer Oberfläche antigenspezifische Rezeptoren, die sogenannten T-Zellrezeptoren, die Antigene nur erkennen, wenn sie auf der Oberfläche von Zellen zusammen mit MHC-Molekülen vorkommen. Als Negativselektion bezeichnet man die Deletion von denjenigen T-Zellen, die mit körpereigenen Antigenen reagieren. Andererseits werden T-Zellen, die präferentiell eigene präsentierende MHC-Moleküle mit Fremdpeptid erkennen, positiv selektioniert. Sie reifen zur funktionsfähigen, immunkompetenten T-Zelle. Der T-Zellrezeptor besteht aus zwei durch Disulfidbrücken verbundenen Polypeptidketten, die immer in Verbindung mit einem weiteren Oberflächenmolekül, dem sogenannten CD3-Komplex, exprimiert werden. Letzterer dient der Signalübertragung in das Zellinnere. Es werden mehrere Subpopulationen und Funktionen von T-Lymphozyten unterschieden. Ähnlich wie bei den B-Lymphozyten werden nach dem Erstkontakt mit einem Antigen T-Gedächtniszellen gebildet, die bei erneutem Kontakt schnell und unter Umständen heftig reagieren (Kayser et al. 1998). Eine andere Gruppe von Tochterzellen, die sogenannten T-Effektorzellen, die nach dem Erstkontakt entsteht, nimmt direkt an der Immunreaktion teil. Trägt eine körperfremde oder virusinfizierte Zelle bzw. eine Tumorzelle ein Antigen in der Kombination mit einem MHC-I-Komplex, so werden diese von CD8-T-Lymphozyten erkannt. Zu diesem Zelltyp gehören die zytotoxischen T-Zellen, die auch als T-Killerzellen bezeichnet werden. Sie sind fähig, nach Stimulation via Zytokinen aus den T-Helferzellen und Bindung an die Zielzelle, diese zu lysieren oder deren Apoptose einzuleiten. Auch die T-Suppressorzellen, deren Existenz jedoch umstritten ist, werden zu den CD8-positiven Zellen gezählt. Sie sollen die Aktivität von B- und T-Lymphozyten hemmen und so überschießende Immunreaktionen unterbinden. T-Helferzellen tragen spezifische CD4-Moleküle auf ihrer Oberfläche. Diese CD4-T-Lymphozyten erkennen Antigene nur in Kombination mit MHC-II-Molekülen. Sie sind auf antigenpräsentierende Zellen angewiesen. Diese sezernieren Lymphokine, die sie selbst, andere T- und B-Zellen, Makrophagen, Neutrophile, Eosinophile und Endothelzellen aktivieren. So werden auch die effektorischen Zellen der unspezifischen Abwehr stimuliert und in die immunologischen Vorgänge eingebunden. Bei den CD4-positiven Zellen werden zwei funktionelle Gruppen unterschieden: TH1-Zellen aktivieren bevorzugt Makrophagen und führen so zu einer Verstärkung der zellulären Immunantwort. TH2-Zellen stimulieren die Bildung von Antikörpern über B-Lymphozyten, also vornehmlich die humoralen Komponenten (Kayser et al. 1998).

1.2.3 Ablauf der Phagozytose

Bei der Abwehr von mykotischen Erregern wird der Phagozytose eine wesentliche Rolle zugeschrieben (Khardori 1989; Deepe and Bullock 1990; Levitz 1992; Diamond 1993). Diesen entscheidenden ersten Schritt der Infektabwehr übernehmen die professionellen Phagozyten. Hierzu zählen neben den neutrophilen Granulozyten auch die als mononukleäre Phagozyten bezeichneten Monozyten bzw. Makrophagen. Dabei kommt den neutrophilen Granulozyten hinsichtlich der Verhinderung einer Kolonisation und anschließender Invasion von Pilzen und Bakterien die größte Bedeutung zu (Levitz 1992; Stickle 1996). Allen gemeinsam ist die Fähigkeit zur Migration in das extravasale Gewebe, da sie amöboid beweglich sind.

Neueren Untersuchungen zufolge hängt der Erfolg dieser Zellen, eine Pilzinfektion unter Kontrolle zu bekommen, maßgeblich von der Infektionsroute, der Größe des Inokulums und dem Status der Wirtsimmunität ab. Erst wenn diese versagt, greifen Mechanismen der erworbenen T- und B-Zellantwort (Mansour and Levitz 2002). So erhöhen quantitative und qualitative Defizite der angeborenen Phagozytenfunktion beispielsweise das Risiko für disseminierte *Candida*- und *Aspergillus*-Infektionen. T-Zelldysfunktionen scheinen hingegen prädisponierend für eine Cryptococcose zu sein.

Dem eigentlichen Vorgang der Phagozytose gehen die Adhäsion der Phagozyten an das Gefäßendothel (Etzioni 1999), die Diapedese in den Extravasalraum (Sixt et al. 2001) und das zielgerichtete Wandern in das entzündliche Gewebe anhand von chemotaktischen Signalen (Harler et al. 1999; Wang et al. 2002) voraus (**Kapitel 1.2.1.3**). Neutrophile Granulozyten exprimieren Oberflächenrezeptoren für Chemokine und pathogene Nebenprodukte, die sie dazu befähigen, sich schnell zum entzündeten Areal rekrutieren zu lassen, sobald sie chemotaktische Stimuli erhalten (Mansour and Levitz 2002). Phagozyten erkennen zahlreiche Erreger anhand hoch konservierter, pathogen-assoziiierter Strukturmerkmale (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs). Dies geschieht mit Hilfe von spezifischen Rezeptoren (pattern-recognition receptors, PRRs). Den Vorgang bezeichnet man als Adhäsion bzw. Adhärenz. Die sogenannten endozytierenden Rezeptoren sitzen an der Phagozyten-Oberfläche und binden das erkannte Pathogen. Werden bestimmte mikrobielle Merkmale erkannt, wird die Phagozytose eingeleitet. Auf diese Weise erkennt der Mannose-Rezeptor beispielsweise spezifisch Kohlenhydrate mit einem hohen Anteil an Mannose, wie sie typisch für Mikroorganismen sind (Fraser et al. 1998). CR3 (complement receptor 3) bindet unter anderem β -Glucanstrukturen an Zymosan, ein

Polysaccharid, das Bestandteil von Hefezellwänden ist (Ross et al. 1985). Lipopolysaccharide und Lipoteichonsäure aus bakteriellen Zellwandkomponenten können vom Makrophagen-Scavenger-Rezeptor (CD14) erkannt werden (Husemann et al. 2002). Außerdem spielen *Toll-like*-Rezeptoren (TLR) eine Rolle bei der anschließenden Signaltransduktion ins Zellinnere.

Durch Opsonisierung der zu phagozytierenden Zelle kann die Bindungsrate an den Granulozyten nochmals deutlich gesteigert werden. Im Falle einer Pilzinfektion erfolgt diese Opsonisierung primär durch Proteine des Komplementsystems, insbesondere durch das Protein C3 (Deepe et al. 1990; Levitz 1992). Durch den intensivierten Kontakt mit dem Fremdpartikel kommt es zu einer Steigerung des oxidativen und glykolytischen Stoffwechsels des Granulozyten. Im weiteren Verlauf formieren sich die Aktinfilamente des Granulozyten zu Pseudopodien, welche das Pathogen umschließen (Roos 1991). Durch Verbindung der inneren Membranenden entsteht ein Phagosom, das im Zellinneren mit einem oder mehreren Lysosomen zum Phagolysosom fusioniert. Der Abbau des inkorporierten Pathogens wird über zwei unterschiedliche Wege eingeleitet. Zum einen erfolgt er sauerstoffunabhängig über das große Repertoire der Granulozytenenzyme wie z.B. Proteasen, saure Hydrolasen und Defensine oder die Änderung des pH-Wertes. Zum anderen wird das Killing sauerstoffabhängig über die Bildung von reaktiven Sauerstoffverbindungen (ROS, *reactive oxygen species*) erzielt. Diesen Vorgang bezeichnet man als *Oxidative Burst* oder auch *Respiratory Burst*, da der Sauerstoffverbrauch der Zelle vorübergehend zunimmt (Janeway et al. 2002). Liegt der Pilz in invasiver Hyphenform vor, müssen sich mehrere Granulozyten und Makrophagen an der Phagozytose beteiligen. Ein regelrechtes Umfließen durch die Pseudopodien gelingt nicht, sodass die gegen das Pathogen gerichteten Substanzen nicht zielgerichtet in den Extrazellularraum abgegeben werden. Dadurch kann es lokal zu Gewebeschäden kommen. Somit stellt die Hyphenform im Gewebe auch einen Pathogenitätsfaktor des betreffenden Pilzes dar (Levitz 1992).

1.3 Pigmente

1.3.1 Definition und Funktion

Unter Pigmenten (lat.: pigmentum=Farbe) versteht man anorganische und organische Substanzen, die sich von den Farbstoffen dadurch unterscheiden, dass sie im Anwendungsmedium unlöslich sind. Sie liegen als fein verteilte Feststoffe (Pigmentteilchen) vor. Die für den Menschen sichtbaren Wellenlängen befinden sich zwischen 400 und 700 nm des elektromagnetischen Spektrums. Sie werden unterhalb 400 nm durch den UV-Bereich und oberhalb 700 nm durch den IR-Bereich limitiert. Der Farbeindruck der Pigmente entsteht entweder durch Absorption oder Reflexion bestimmter Frequenzanteile des sichtbaren Lichts. Weißes Licht umfasst alle Wellenlängen des sichtbaren Lichts. Farbige Substanzen absorbieren einen bestimmten Teil der Wellenlängen, die anderen werden reflektiert (Schwarz and Berchtold 2006). Alle reflektierten Wellenlängen ergeben letztendlich den jeweiligen Farbton, wobei der entstandene Farbton komplementär zur Farbe der absorbierten Wellenlängen ist (**Abbildung 2**).

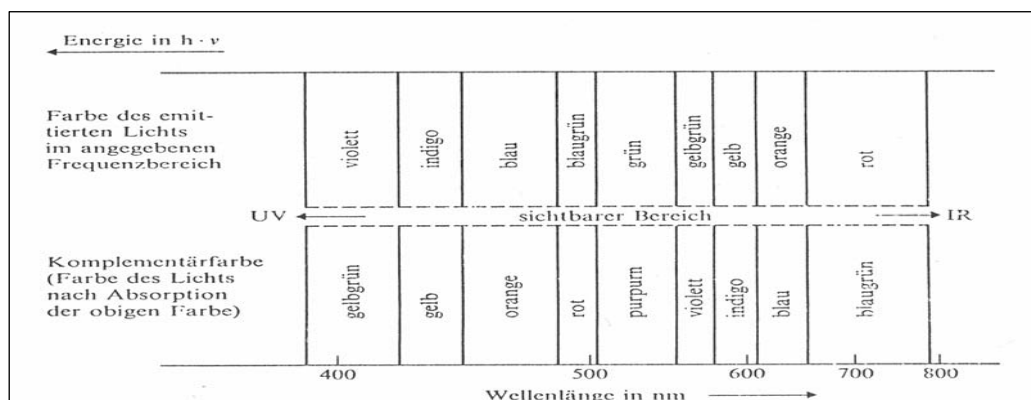


Abbildung 2: Ausschnitt des elektromagnetischen Spektrums im sichtbaren Bereich (nach Greenwood and Earnshaw 1990)

Die Aufgabe der Pigmente in der Natur beschränkt sich aber nicht nur auf die Farbgebung der Zellen und Gewebe. Viel bedeutsamer ist, dass zahlreiche natürliche Pigmente mit wichtigen metabolischen oder physiologischen Prozessen verknüpft sind. So spielen das Chlorophyll der Pflanzen in der Photosynthese oder Hämoglobin, das Pigment der Erythrozyten als Träger von Sauerstoff, eine wichtige Rolle.

Pigmente können in zwei Gruppen unterteilt werden: Als endogene Pigmente bezeichnet man die Zwischen-, Neben- und Endprodukte des Stoffwechsels. Hämatoidin, Hämosiderin und Bilirubin sind Abbauprodukte von Hämoglobin. Ferner gehören Melanine und Lipofuszin als autochthone Pigmente zu den endogenen Pigmenten. Pigmente, die dem Körper von außen zugeführt werden, bezeichnet man als exogene Pigmente. Hierzu gehören beispielsweise Kohle und Tusche, die sich als Ablagerungen in allen Organen in Form von Anthrakosen darstellen können.

1.3.2 Pigmente bei Pilzen

Pilze sind fähig, ein großes Spektrum verschiedenster Pigmente mit unterschiedlichen Funktionen zu synthetisieren. Daraus ergibt sich die Tatsache, dass bis jetzt nur einige dieser Pigmente detailliert erforscht sind. Pigmente wie Carotenoide, Naphthoquinone, Phenoxazine und Flavonoide werden von diversen Pilzen gebildet. Hier soll explizit auf Melanine und Indolalkaloide bzw. Tryptophanpigmente eingegangen werden.

1.3.2.1 Melanine

Als Melanine bezeichnet man eine Gruppe von Pigmenten unterschiedlichen Ursprungs (Bakterien, Pflanzen, Pilzen, Tieren und Menschen), aber gleicher Eigenschaften. Dazu zählen die Unlöslichkeit in Wasser oder organischen Lösungsmitteln, Heterogenität, UV-Protektion, die Neutralisation von Oxidantien und die Fähigkeit, Radikale abzufangen (Juncu 2007). Es handelt sich um Makromoleküle, die durch oxidative Polymerisation von phenol- oder indolhaltigen Komponenten entstanden sind (Hamilton and Holdom 1999; Jacobson 2000; Hamilton and Gomez 2002; Langfelder et al. 2003). Melanine sind multifunktionale Polymere mit typischer dunkelbrauner bis schwarzer Farbe.

Dixon et al. beschrieben Melanin bereits 1987 als Virulenzfaktor von *Exophiala dermatitidis*. Einige Pilze katalysieren die Melaninproduktion mittels Polyketidsynthasen (PKS). Das Molekül stammt hauptsächlich vom Vorläufermolekül 1,8-Dihydroxynaphthalen (DHN) ab (Feng et al. 2001). *Exophiala dermatitidis* diente als Modell zur Erforschung der Biosynthese von DHN-Melanin über den PKS-Weg. 1,3,6,8-Tetrahydroxynaphthalen wird dabei in den letzten Syntheseschritten zu Scytalon, dann zu Vermelon und schließlich zu DHN umgeformt (**Kapitel 3.1.1, Abbildung 8**). Dabei inhibiert das reduktive Enzym Tricyclazol die Transformation von Scytalon zu Vermelon (Feng et al. 2001; Jacobson 2000; Langfelder et al. 2003). Feng et al. gelang dadurch 2001 die Darstellung des Polyketidsynthase-Gens WdPKS1 von *Exophiala dermatitidis*.

Andere Pilze, wie *Cryptococcus neoformans* beispielsweise, synthetisieren Melanin aus Dihydroxyphenylalanin (DOPA). Melanin wird von einer Vielzahl human- und pflanzenpathogener Pilze wie z.B. *Exophiala dermatitidis*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus* und *Magnaporthe grisea* als protektive Substanz in der Zellwand eingelagert. Es stellt somit ein wichtiges Pathogenitätsmerkmal dar. Bei *Exophiala dermatitidis* dient es unter anderem als Schutz vor dem Killing (Peltroche-Llacsahuanga et al. 2003) und dem Oxidativen Burst (Heidrich 2010).

1.3.2.2 Indolalkaloide

Indolalkaloide bilden die größte Alkaloidgruppe mit ca. 1.500 Vertretern. Charakterisiert sind sie durch den Indolgrundkörper (**Abbildung 3**). Entsprechend ihrer biogenetischen Herkunft aus der Aminosäure L-Tryptophan tragen sie fast alle an Stellung 3 des Indolringes einen 2-Aminoethylrest. Dieser ist meistens in einem oder mehreren am Indol in 2,3-Position annelierten Ringen intergriert. Einige Vertreter entstehen durch Verknüpfung von zwei substituierten Indolgrundkörpern, die dann als Bis-Indolalkaloide bezeichnet werden. Dadurch ergeben sich oft komplexe Strukturen (Hesse 2000).

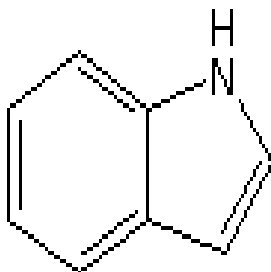


Abbildung 3: Indolgrundkörper (C₈H₇N)

Als Naturpigmente sind Indole schon lange bekannt. Sie zählen zu den bekannten Syntheseprodukten von Pilzen und anderen Mikroorganismen, Flechten, höheren Pflanzen und Tieren. Medizinische Relevanz besitzen pharmakologische Substanzen wie z.B. das indirekte Parasympathomimetikum Physostigmin (**Abbildung 4**), Ergotalkaloide wie Ergotamin, einem Mutterkornalkaloid des Schlauchpilzes *Claviceps purpurea*, das bei Migräne eingesetzt wird oder auch das Antiarrhythmikum Ajmalin aus *Rauwolfia*-Arten.

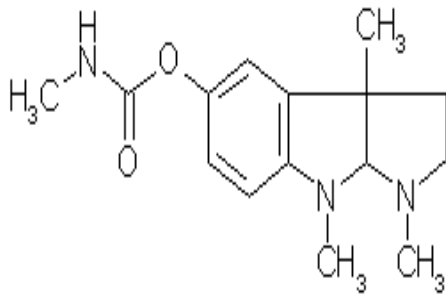


Abbildung 4: Physostigmin ($C_{15}H_{21}N_3O_2$, MW 275,35)

Mayser et al. entdeckten 1998 erstmals, dass die Hefe *Malassezia furfur* auf einem Nährboden mit L-Tryptophan als alleiniger Stickstoffquelle bislang unbekannte Pigmente und Fluorochrome synthetisiert (Mayser et al. 1998). Diesen wird eine enge Verbindung zum klinischen Bild und der noch nicht vollständig aufgeklärten Pathogenese der *Pityriasis versicolor* zugeschrieben. Die Erkrankung zeichnet sich durch depigmentierte, später konfluierende Areale insbesondere im Bereich der vorderen und hinteren Schweißrinne aus. Die Veränderungen fluoreszieren typischerweise gelb-grün unter der Woodlampe und weisen trotz Depigmentierung eine Hyposensibilität gegenüber UV-Strahlen auf. Das erste daraus isolierte Indolalkaloid Malassezin wird für die Depigmentierungserscheinungen bei der *Pityriasis versicolor* verantwortlich gemacht (**Abbildung 5**). Es handelt sich bei der Substanz um das 2,3-Methylenbisindolyl-3-carbaldehyd, welches ein Aryl-Hydrocarbon-Rezeptoragonist ist und *in vitro* Apoptose bei Melanozyten induziert (Krämer et al. 2005b).

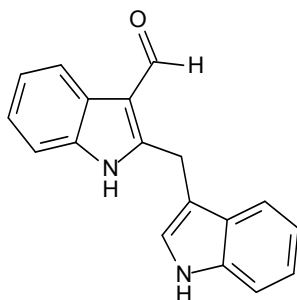


Abbildung 5: Malassezin ($C_{18}H_{14}N_2O$, MW 274.32)

Einen weiteren potenten UV-Filter neben Melanin, Scytonemin und Flavonoiden stellt das von *Malassezia furfur* synthetisierte gelbe Pityriacitrin (**Abbildung 6**) dar, das eine breite Absorption im UV-Bereich zeigt (Mayser et al. 2002; Juncu 2007) und vor dem Zelltod durch UVB-Strahlung schützt (Machowinski et al. 2006). Pityriacitrin könnte das Phänomen der Hyposensibilität der depigmentierten Areale gegenüber UV-Licht bei der *Pityriasis versicolor* erklären. Auch bei *Exophiala dermatitidis* konnte Pityriacitrin in 13 Isolaten nachgewiesen werden (Nies 2006). Zuther et al. gelang 2008 der Nachweis der spontanen Entstehung dieses Pigmentes aus Indolpyruvat und Tryptophan bei *Ustilago maydis*.

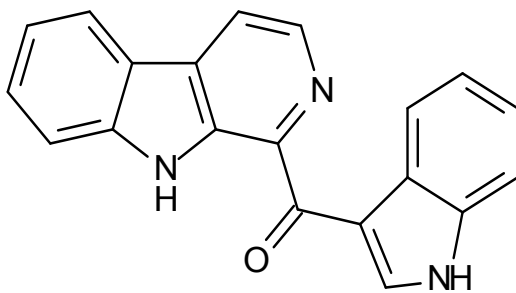


Abbildung 6: Pityriacitrin ($C_{20}H_{13}N_3O$, MW 311.34)

Mayser et al. konnten 2003 eine weitere Substanz aus dem Tryptophanmetabolismus von *Malassezia furfur* darstellen, das Pityrialacton. Ihm wird die gelb-grüne Fluoreszenz der Läsionen im Wood-Licht bei 366 nm zugesprochen. Des Weiteren konnten drei biologisch aktive Bis(indolyl)spirane isoliert werden (Irlinger et al. 2004). Die orange-roten Pityriarubine A, B und C ähneln strukturell Proteinkinase C-Inhibitoren. Diese hochpotenten Hemmer des oxidativen Burst von neutrophilen Granulozyten liefern einen möglichen Erklärungsansatz für die ausgeprägt schwache inflammatorische Immunantwort bei der *Pityriasis versicolor* (Krämer et al. 2005a).

Kindler et al. veröffentlichten 2010 den vermuteten Syntheseweg von Exophialin und 8-Hydroxyexophialin, zwei Indolalkaloiden, die aus Kulturen des Wildtyps und der Mutante Mel-1 von *Exophiala dermatitidis* auf einem Tryptophanmedium gewonnen werden konnten. Diese weisen für Indolalkaloide unübliche Strukturen auf, da sie aromatische Pentaketide enthalten (**Abbildung 7**). Inwieweit diese Pigmente eine Rolle in der Pathogenität von *Exophiala* spielen, muss experimentell noch genauer geklärt werden.

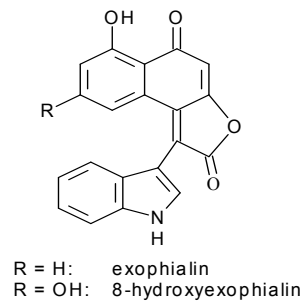


Abbildung 7: Exophialin bzw. 8-Hydroxyexophialin

Heidrich (2010) gelang die Fokussierung auf ein graues Tryptophanpigment („Anthrazit“), das von *Exophiala dermatitidis* auf dem Mangelmedium synthetisiert wird. Nach Zugabe dieses Pigmentes zu einem Vollblutansatz konnte eine hochsignifikante Hemmung des Oxidative Burst beobachtet werden.

2 Hintergrund und Fragestellung

Exophiala dermatitidis nimmt unter den Schwärzepilzen hinsichtlich des Spektrums an Erkrankungen eine einzigartige Stellung ein. Diese erstreckt sich von rein oberflächlichen Hauterkrankungen bis hin zu fulminant verlaufenden Infektionen bei Mensch und Tier. Bislang sind einzelne Komponenten bezüglich der Pathogenität dieses Pilzes weitestgehend ungeklärt. Bisherige Untersuchungen auf mögliche Pathogenitätsfaktoren beschränkten sich meist auf den bedeutendsten Virulenzfaktor Melanin (Dixon et al. 1987) oder die Carotenoide (Schnitzler et al. 1999), die von *Exophiala dermatitidis* gebildet werden.

Als Mayser et al. 1998 erkannten, dass *Malassezia furfur* auf einem Minimalagar, dem Tryptophan als alleinige Stickstoffquelle zugesetzt ist, zur Bildung von Tryptophanpigmenten angeregt werden kann, konnten in den darauffolgenden Jahren einige Schritte in der Pathogenese der *Pityriasis versicolor* erhellt werden (Mayser et al. 1998; Mayser et al. 2002; Mayser et al. 2003; Irlinger et al. 2004; Mayser et al. 2004; Krämer et al. 2005; Juncu 2007). Auch bei der phylogenetisch weit entfernten Hefe *Candida glabrata* konnte eine Tryptophan-abhängige Pigmentbildung nachgewiesen werden (Mayser et al. 2007).

Bei *Exophiala dermatitidis* gelang Nies (2006) die Induktion der Pigmentbildung auf dem Tryptophanmedium (1b-Agar). Untersucht wurden auch diverse Mutanten von *Exophiala dermatitidis*, die hinsichtlich der Biosynthese von 1,8-Dihydroxynaphthalen - und somit der Melaninsynthese - Lücken aufweisen. Neben dem bereits bekannten Pityriacitrin gelang der Nachweis von zwei neuen Indolalkaloiden, dem Exophialin und dem 8-Hydroxyexophialin bei *Exophiala dermatitidis* (Kindler et al. 2009). Dabei bildet der Wildtyp hauptsächlich Exophialin, die Mutante Mel-1 dagegen 8-Hydroxyexophialin. Da Exophialin bereits im Rohextrakt nachweisbar ist, kann ausgeschlossen werden, dass es sich um ein Artefakt beim Aufreinigungsprozess handelt (Kindler et al. 2009). Inwieweit diese Pigmente eine Rolle als Pathogenitätsfaktoren von *Exophiala dermatitidis* spielen, war ein wichtiger Ansatz für weiterführende Untersuchungen. So gelang Heidrich 2010 eine Studie über den Einfluss der Pigmente auf den „Oxidative Burst“. Bei der Mutante Mel-1 konnte durch HPLC die Bildung von Pityriacitrin bestätigt werden, des Weiteren konnte Exophialin nachgewiesen werden. Die bisher nicht genauer untersuchte Mutante Mel-3 bildet ebenfalls Exophialin, aber auch Pityriacitrin und Pityriarubin C. Nachgewiesen werden konnte beim Wildtyp erstmals die Synthese von Pityriacitrin, Pityriarubin C, Exophialin und Desoxyexophialin. Bei den anschließenden Untersuchungen zum Einfluss des Pigmentspektrums auf den „Oxidative Burst“ konnte dessen deutliche Hemmung durch den Wildtyp gegenüber Mel-3 konstatiert werden. Dies kann durch die protektive Wirkung des Melanins erklärt werden (Heidrich

2010).

Die Darstellung der Phagozytose von *Exophiala dermatitidis* im Vollblutansatz gelang bisher nicht. Dennoch schien es unumgänglich, auch den Einfluss der Indolalkaloide auf die Phagozytose als mögliches Anschauungsmodell für weitere potentielle Pathogenitätsfaktoren des Pilzes *in vitro* zu untersuchen. Ziel der vorliegenden Studie war demnach, eine Methode zur Darstellung der Phagozytose von *Exophiala dermatitidis* durch humane neutrophile Granulozyten am Durchflusszytometer zu etablieren.

Von Heidrich (2010) konnte eine bisher unbekannte graue Bande, die aus der Mutante Mel-3 gewonnen wurde, für eine hochsignifikante Hemmung des „Oxidative Burst“ verantwortlich gemacht werden. Dieser Hemmstoff wurde als „Anthrazit“ bezeichnet und wird offenbar in verschwindend geringen Mengen von Mel-3 produziert. So war es ein weiteres Ziel dieser Arbeit, den hochpotenten Hemmstoff mittels Massenproduktion zu isolieren und unter Umständen strukturell aufzuklären.

Zusammenfassend ergaben sich für die vorliegende Studie somit folgende Fragen:

1. Wie lässt sich die Phagozytose von *Exophiala dermatitidis* durch menschliche neutrophile Granulozyten am Besten am Durchflusszytometer darstellen?
2. Besitzen die von *Exophiala dermatitidis* synthetisierten Tryptophanpigmente einen Einfluss auf das Phagozytoseverhalten der Granulozyten?
3. Gelingt es, den hochpotenten Hemmstoff des „Oxidative Burst“ - das Anthrazit – in größerer Menge zu extrahieren und strukturell aufzuklären? Wie ist seine Wirkung in Bezug auf die Phagozytose?
4. Wie fällt das Phagozytose-Modell mit *Exophiala dermatitidis* (Mel-3) bei Zusatz eines Metaboliten aus *Malassezia furfur* (Pityriazol) aus?

3 Material und Methoden

3.1 Herstellung von Rohextrakt und Isolation der Pigmente

3.1.1 Zugrundeliegende Referenzstämme von *Exophiala dermatitidis*

In dieser Studie wurde zum einen der Wildtyp (P202) des Schwärzepilzes *Exophiala dermatitidis* verwendet, zum anderen die schon in einer vorausgehenden Arbeit hinsichtlich des Oxidative Burst als hochinteressant erscheinende Melaninmangelmutante Mel-3 (P201, Heidrich 2010). Dabei wurde in der vorliegenden Studie ebenfalls auf *Exophiala dermatitidis*-Stämme von Prof. Dr. Gerhard Haase aus dem Institut für medizinische Mikrobiologie des Universitätsklinikums Aachen zurückgegriffen (**Tabelle 1**). Der Wildtyp zeichnet sich durch Melanineinlagerungen in der Zellwand aus und imponiert durch dunkelbraun gefärbte Kolonien auf dem Agar, wohingegen Mel-3 unpigmentiert ist und damit weiß erscheint. Es handelt sich um eine spontane Mutation in einem frühen Syntheseschritt des Melanins, sodass keine Melaninbildung mehr stattfindet (**Abbildung 8**).

Tabelle 1: Referenzstämme der Studie

Pilzname	Genotyp	Herkunft	Listung	Stammnummer
<i>Exophiala dermatitidis</i>	A	Prof. Dr. Haase Aachen	Wildtyp ATCC No.34100	P 202
<i>Exophiala dermatitidis</i>	A	Prof. Dr. Haase Aachen	Mel 3 ATCC No.44504	P 201

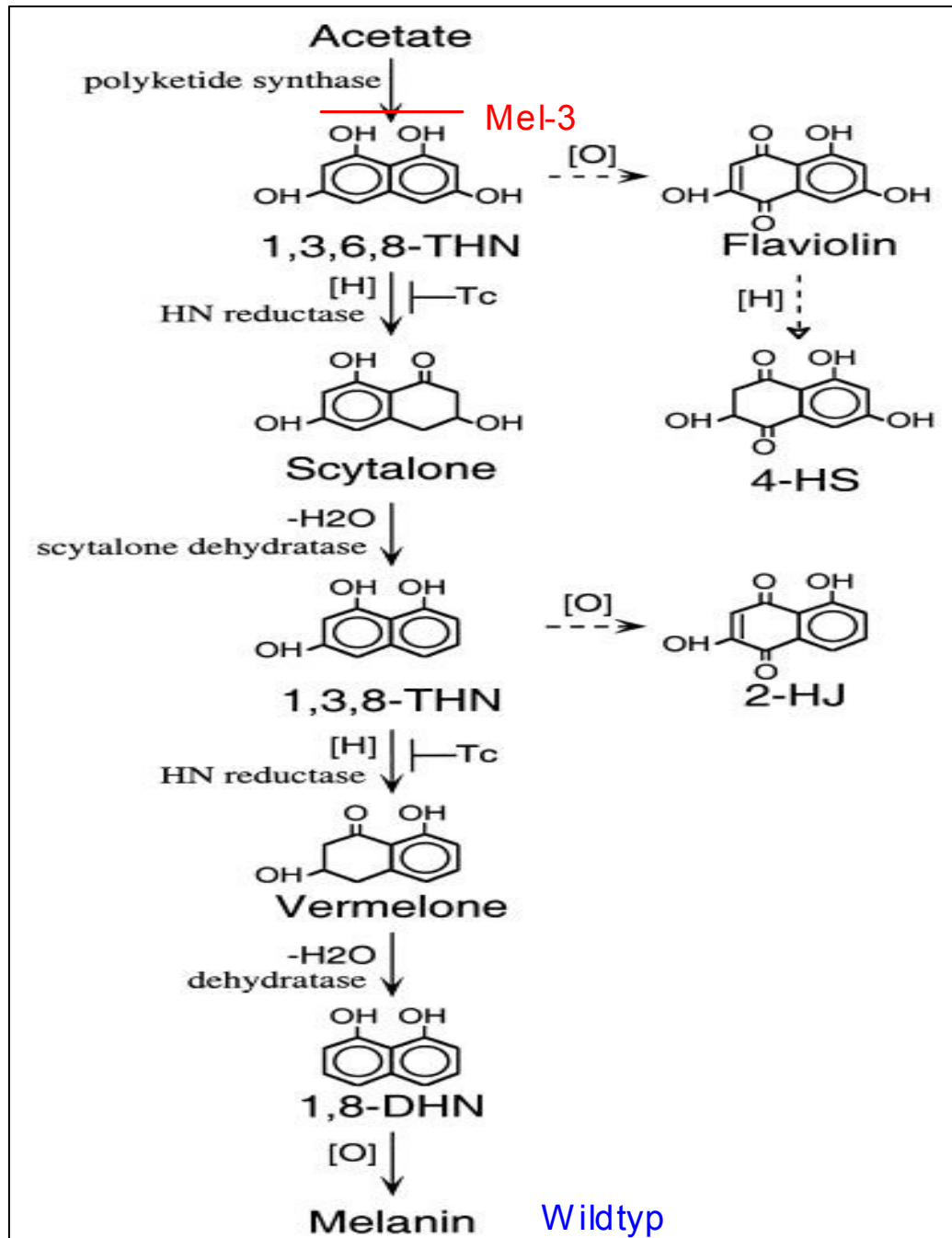


Abbildung 8: Melaninsyntheseweg in *Exophiala dermatitidis* (modifiziert nach Juncu 2007)

3.1.2 Stammhaltung und Kultur der Hefen

Die Stämme sind bei -196°C in flüssigem Stickstoff jeweils in Kunststoffröhrchen (Cryo tube vials, Nunc, Roskilde, Dänemark) kryokonserviert (HC 35, Taylor-Wharton, Königsstein). Nach Auftauen wurden die beiden Stämme auf Selektivagar für pathogene Pilze verimpft (SPF, Merck, Darmstadt). Dieser enthält neben den für das Wachstum der Pilze erforderlichen Nährstoffen wie Peptone und Glukose (je 10 g/l) auch noch Cycloheximid (0.4 g/l) zur Vermeidung der Kontamination mit Schimmelpilzen und zur Unterdrückung einer eventuellen bakteriellen Begleitflora das Antibiotikum Chloramphenicol (0,05 g/l). Die beimpften Platten wurden bei 32°C in einem Brutschrank (Heraeus Holding GmbH, Hanau) für je fünf bis sechs Tage inkubiert und stets weiter subkultiviert, um eine möglichst große Anzahl an Reinkulturen zu gewinnen.

Um nun die Pigmentsynthese zu induzieren, wurden Kolonien der Reinkulturen mit Hilfe steriler Tupfer (Cotton buds, Karl Beese, Barsbüttel) unter der Sterilbank auf einen Minimalagar verbracht. Diesem sogenannten 1b-Agar sind nur wenige Inhaltsstoffe zugesetzt, sodass dem Keim nur Glukose, eine Lipid- und eine Stickstoffquelle, in Form der Aminosäure Tryptophan, zum Wachstum zur Verfügung stehen (**Tabelle 2**). Seine Herstellung erfolgte eigenständig im Labor.

Tabelle 2: Inhaltsstoffe zur Herstellung von 300 ml 1b-Agar

Inhaltsstoff	Menge / 300 ml Aqua dest.	Hersteller
Agar-Agar	6 g	Merck, Darmstadt
D (+)-Glucose	3 g	Merck, Darmstadt
KH_2PO_4	3 g	Merck, Darmstadt
MgSO_4	1,5 g	Merck, Darmstadt
Tween 80	9 ml	Sigma-Aldrich
L-Tryptophan	0,9 g	Fluka Biochemika

Die Inhaltsstoffe wurden abgewogen (Mettler Toledo, PB 602, Schweiz), in einen 500 ml fassenden Erlenmeyerkolben überführt und in 300 ml Aqua dest. gelöst. Anschließend wurde das Gemisch 50 Minuten bei 1 bar autoklaviert (Melag Autoklave Typ 23, Melag, Berlin). Das Tween 80 sowie Tryptophan wurden erst im Anschluss bei etwa 50°C zugegeben. Zur weiteren Bearbeitung wurde das noch flüssige, transparente Medium unter die Sterilbank (Uniflow Biohazard Laminar Flow Sicherheitsbank, Typ UVUB 1200, Uniequip Laborgeräte, Martinsried) verbracht und in 15 ml-Portionen auf Kunststoffpetrischalen mit Deckel (10 cm Durchmesser, Nunc, Roskilde, Dänemark) verteilt.

3.1.3 Rohextraktgewinnung

Von beiden *Exophiala dermatitidis*-Stämmen wurden je 200 Platten des 1b-Agars bei 32°C für die Dauer von vier Wochen im Brutschrank (Heraeus Holding GmbH, Hanau) inkubiert. Zusätzlich wurden nochmals 1.000 1b-Platten produziert und mit der Melaninmangelmutante Mel-3 beimpft. Diese dienten einer möglichst großen Ausbeute des Oxidative Burst-Hemmstoffes „Anthrazit“ und wurden, wie oben beschrieben, bebrütet. Bereits nach 3-4 Tagen konnte anhand des Farbumschlages des Nährmediums von farblos nach hellbraun bis braun sichergestellt werden, dass die Pigmentsynthese unter Bildung von Tryptophanmetaboliten vonstatten ging. Lediglich die Farbtintensität und damit die Quantität des Pigmentes erforderte die vierwöchige Inkubationszeit. Auch eine Kontrolle unter UV-Licht bei 254 bzw. 366 nm mit deutlicher gelb-grünen Fluoreszenz des Nährbodens verifizierte die Pigmentinduktion. Zur Gewinnung des Rohextraktes wurde der Inhalt von je 45 Platten in ein 5 l fassendes Becherglas verbracht, indem der Agar vorsichtig mit einem Holzspatel vom Boden der Plastikpetrischale abgelöst wurde. Mit einem Pürierstab wurde die Masse homogenisiert und mit 1,8 l Ethylacetat versetzt. Die befüllten Bechergläser standen für 48 Stunden lichtgeschützt und abgedeckt bei Raumtemperatur. Um nun die festen Bestandteile in Form von Agar von dem in Ethylacetat gelösten Pigment trennen zu können, wurde die Suspension über einen Glastrichter mit zugesetzter Glaswolle filtriert. Anschließend erfolgte das Eingießen des gewonnenen Filtrates in einen vorab verschlossenen Scheidetrichter. Zur Auftrennung wurde Aqua dest. in gleicher Menge zugesetzt und vermischt. Bereits nach zehn Minuten konnte eine deutliche Phasentrennung beobachtet werden. Im untersten Teil des Trichters setzte sich Wasser ab, mittig war eine wolkige Schicht erkennbar, in der sich das Tween (Fett) sowie Agarreste befanden, und im obersten Drittel stellte sich die in Ethylacetat gelöste Pigmentphase dunkelbraun gefärbt dar. Die trotz Auftrennung verbliebenen Wasserreste in der entscheidenden Ethylacetatphase wurden unter Zusatz von Natriumsulfat (Merck, Darmstadt) gebunden. Zur weiteren

Trennung der Pigmente vom Ethylacetat wurde das Gemisch in Kolben an einem Rotationsverdampfer (Typ VVI, Heidolph- Elektro KG, Kehlheim) abrotiert. Dabei wird das Ethylacetat durch ein aufgebautes Vakuum sublimiert, über eine Kühlung kondensiert und in einem separaten Kolben aufgefangen. Danach wurde der trockene Pigmentextrakt mit je 1,5 ml 96%igem Methanol (Merck) versetzt und in 1,8 ml fassenden Gewindeflaschen zur weiteren Verarbeitung verbracht.

Die Aufbewahrung erfolgte lichtgeschützt bei einer Temperatur von $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.1.4 Säulenchromatographie

Der Pool aus Rohextraktgemisch wurde mit Hilfe der Säulenchromatographie, die eine Niederdruckchromatographie darstellt, einer ersten Auftrennung unterzogen. Es handelt sich dabei um eine Gelpermeationschromatographie, wobei die stationäre Phase aus Kieselgel (Sephadex LH 20, Sigma) und die mobile Phase aus Methanol (96%, Merck) besteht. Die Länge der hier benutzten Säule betrug 525 mm (NS29 mit Fritte, Fa. Pfeuffer). Entsprechend der jeweiligen Größe der vorhandenen Moleküle wird das Gemisch nun aufgetrennt. Hierbei beruht die Trennung auf dem Prinzip einer Siebwirkung der stationären Phase, die sich durch kleine Poren auszeichnet. Diejenigen Stoffe mit kleiner Molmasse verteilen sich demnach besser als diejenigen mit hoher molekularer Masse, d.h. große Moleküle passieren die Säule insgesamt schneller, da sie sich fast ausschließlich in der mobilen Phase befinden, wohingegen sich kleine Moleküle sowohl in der mobilen als auch in der stationären Phase verteilen. Um einen konstanten Fluss der mobilen Phase (20 ml/min) zu gewährleisten, wurde mit einem Gummiball kontinuierlich Druck aufgebaut. Nun wurden die in verschiedene Farbtönen aufgetrennten Bereiche in der Säule im Tageslicht, wie auch unter Zuhilfenahme einer UV-Lampe (Desaga GmbH, Heidelberg) bei 366 nm fraktioniert. Anschließend erfolgte deren Trocknung einzeln im Rotationsverdampfer. Die gewonnenen Fraktionen wurden in Methanol gelöst und in Autosampler-Gewindeflaschen bei $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Tabelle 3 sind sowohl Anzahl als auch Farbtönen (Tageslicht/UV-Licht 366 nm) der jeweiligen *Exophiala*- Fraktionen zu entnehmen.

Tabelle 3: Anzahl der Fraktionen beider Stämme und deren Aussehen nach Säulenchromatographie

Wildtyp *Exophiala dermatitidis* (P 202)

Fraktion	Farbe der Säule bei Tageslicht	Farbe der Säule bei 366 nm	Farbe des Auffanges *
F1	dunkelbraun	lila-braun	bräunlich-gelb
F2	braun	bläulich	dunkelgelb
F3	braun	grünlich	hellgelb
F4	braun	dunkelbraun-violett	zitronengelb
F5	braun	türkis	goldgelb
F6	braun	dunkelbraun + blau	orange
F7	braun	bräunlich blau	orange

Mel-3 *Exophiala dermatitidis* (P 201)

Fraktion	Farbe der Säule bei Tageslicht	Farbe der Säule bei 366 nm	Farbe des Auffanges *
F1	braun	grün	dunkelorange
F2	beige	blau	goldgelb
F3	dunkelbeige	bläulich-ocker	goldgelb
F4	dunkelbeige	blau-violett	gelb
F5	hellbraun	hellgrün	dunkelgelb
F6	braun	violett	gelb
F7	orange- braun	grün	orange
F8	orange- braun	violett	orange
F9	orange- braun	oliv	orange
F10	orange- braun + beige	blaugrün + violettblau	gelb

* nach Säulendurchlauf bei Tageslicht

3.1.5 Dünnschichtchromatographie

Als eine weitere Methode wurde von der Dünnschichtchromatographie als einem physikalisch-chemischen Trennverfahren Gebrauch gemacht. Auch hier wird die zu untersuchende Probe mittels mobiler und stationärer Phase aufgetrennt. Dabei ist besonders vorteilhaft, dass man ohne großen apparativen Aufwand eine hohe Trennleistung erreichen kann und es gleichzeitig einer geringen Substanzmenge bedarf. In eine Laufkammer wurde unter dem Abzug als mobile Phase ein Laufmittelgemisch gegeben, das sich aus Toluol, Ethylformiat und Ameisensäure im Verhältnis von 10:5:3 zusammensetzt. Bei der festen Phase handelt es sich um eine Glasplatte, die mit einem sehr feinkörnigen Kieselgel (Kieselgel 60-Platten, Merck) beschichtet ist.

Die einzelnen in Methanol aufgenommenen Fraktionen der Säulenchromatographie (**Kapitel 3.1.4**) wurden nun per Linomat (Camag, Muttenez, Schweiz) in Form von Banden auf die Kieselgelplatten dünn aufgetragen. Für die Dauer von 45 Minuten wurden die Platten nach Absättigung mit dem Laufmittelgemisch in die zugehörige Kammer verbracht und diese verschlossen. Aufgrund von Kapillarkräften saugte sich das Laufmittel in die senkrecht zu diesem positionierte Platte. Die in der aufgetragenen Bande enthaltenen Moleküle gingen somit in Lösung und wurden mit der mobilen über die stationäre Phase transportiert und aufgetrennt, da sie, ausgehend von den aufgewendeten Kräften unterschiedlich weit liefen. Nach Abschluss der Inkubationszeit wurde die Grenze des noch feuchten und damit noch sichtbaren Laufmittels gekennzeichnet und die Platte unter dem Abzug getrocknet. Anschließend konnten die Kieselgelplatten mit dem für den jeweiligen *Exophiala*-Stamm charakteristischen Bandenmuster fotografiert werden (Camag Reprostar 3, Camag, Muttenez, Schweiz). Um tatsächlich alle entstandenen Banden lokalisieren und detektieren zu können, wurde die Platte unter verschiedenen Filtersystemen wie auch nach Derivatisierung fotografiert. Somit konnte durch Bedampfen der DC-Platten mit Salzsäure (rauchend, 37%, Merck) und Ammoniaklösung (reinst, 33%, Merck) auch eine Aussage über das Verhalten und die Stabilität der einzelnen Substanzen in Abhängigkeit vom pH-Wert getroffen werden. Außerdem konnten die R_f -Werte der einzelnen Banden mit dem WinCats-Programm bei Tages- und UV-Licht berechnet werden. Um verschiedene DC-Platten vergleichen zu können, werden die so genannten R_f -Werte (Retentionsfaktor, Rückhaltefaktor, *ratio of fronts*) berechnet. Es handelt sich dabei um das Verhältnis der Wanderungstrecke der Substanz (S) zu der des Lösemittels (L). Somit sind die R_f -Werte bei Verwendung des gleichen Plattenmaterials und Laufmittels Stoffkonstanten (**Abbildung 9**).

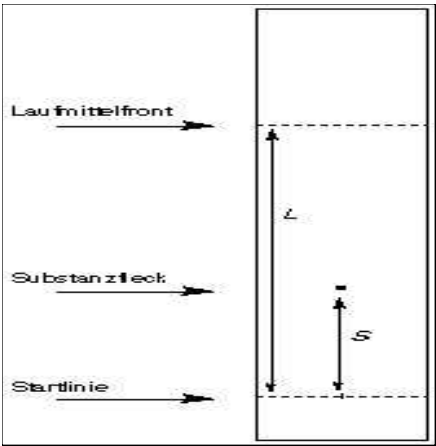


Bild 1	Aufnahme bei Tageslicht
Bild 2	Aufnahme bei 366 nm
Bild 3	Aufnahme bei 254 nm
Bild 4	Aufnahme bei Tageslicht nach Bedampfen mit HCl
Bild 5	Aufnahme bei 366 nm nach Bedampfen mit HCl
Bild 6	Aufnahme bei Tageslicht nach Bedampfen mit Ammoniaklösung
Bild 7	Aufnahme bei 366 nm nach Bedampfen mit Ammoniaklösung

Bild 1

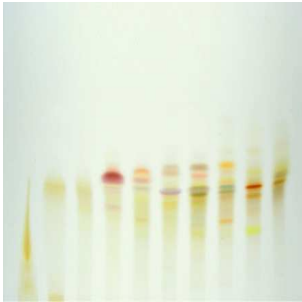


Bild 2

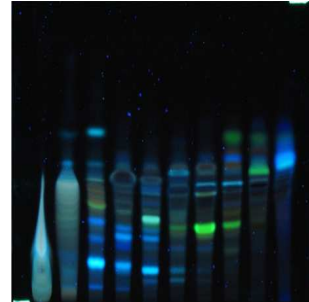


Bild 3

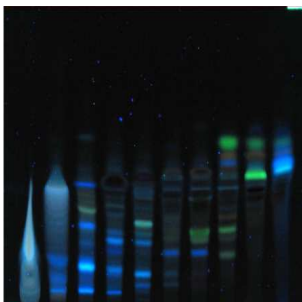


Bild 4

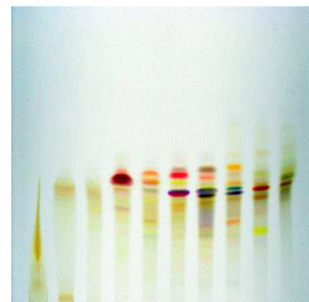


Bild 5

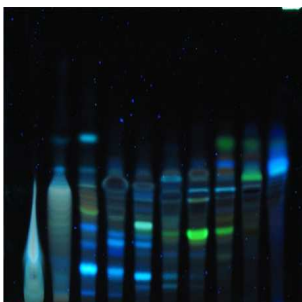


Bild 6

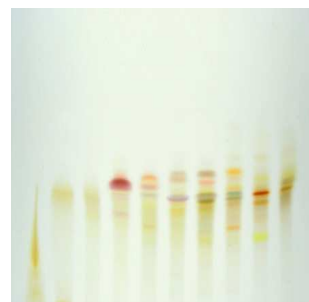
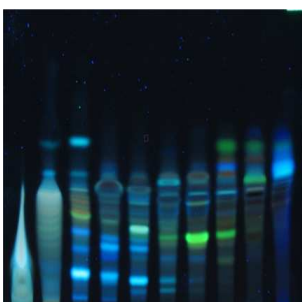


Bild 7



3.1.6 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) stellt eine weitere analytische Methode dar. Die HPLC ist ein Flüssigchromatographie-Verfahren, mit dem man nicht nur Substanzen trennt, sondern diese auch über Standards, also bekannte Reinsubstanzen identifizieren und quantifizieren kann. Im Unterschied zur Gaschromatographie, die eine sehr gute Trennmethode für verdampfbare Stoffe ist, können mittels HPLC auch nichtflüchtige Substanzen analysiert werden, was bei den zuvor gewonnenen Banden der DC-Fractionen der Fall ist. Die Auswahl der DC-Fractionen zur Aufreinigung via HPLC wurde aufgrund der Versuchsergebnisse nach deren Zugabe getroffen. Es wurden demnach nur DC-Fractionen weiter aufgereinigt, die eine Auswirkung auf die Phagozytose zeigten. Besagte Fractionen wurden einzeln nochmals auf DC-Platten aufgetragen, im Tages- und UV-Licht beurteilt. Anschließend wurden die einzelnen Banden ausgekratzt und in je 1 ml Methanol gelöst.

Über einen direkten Vergleich von bekannten Retentionszeiten mit denen eines Bestandteils der zu untersuchenden Probe (externe Standardisierung) oder aber indirekt über die Zugabe einer bekannten Substanz zu der zu analysierenden Probe (interne Standardisierung) kann die Identifizierung bzw. Quantifizierung erfolgen. Es kamen zwei verschiedene Arten der HPLC zum Einsatz: die präparative und die analytische HPLC. Hierbei war die Maxime zunächst, die Pigmente in optimaler Reinheit und Quantität zu isolieren (präparative HPLC), um anschließend mit geringen Mengen eine maximale Ausbeute der einzelnen Bestandteile der Fractionen zu erhalten (analytische HPLC). Ziel war die chemische Identifikation der Einzelkomponenten.

3.1.6.1 Präparative HPLC

Diese reversed-Phase-HPLC diente der Aufreinigung der bis dato recht komplexen DC-Banden, die noch bis zu fünf Banden enthielten. Eine lipophile LiChrospher-RP8-Säule (Merck, Darmstadt, 30x250 mm) bildete die stationäre Phase, sodass vor allem unpolare Substanzen, die sich in der Probe befanden, mit der Säulenfüllung interagieren konnten. Die temporäre Phase bestand aus einem Wasser-/Acetonitrilgemisch (Lösungsmittel Gradient Grade, Merck, Darmstadt), dessen Flussrate 5 ml/min betrug. Um einen linearen Gradienten (100-0 % Wasser bzw. 0-100% Acetonitril) aufzubauen, nahm der Wassergehalt des Gemisches über den Zeitraum von 180 Minuten ab. So verblieben lipophile, unpolare Substanzen entsprechend länger auf der Säule als hydrophile. Mittels einer Gilson Masterpumpe M305, die an eine weitere Pumpe (Gilson M302) gekoppelt war, wurde der

Gradient erzeugt und aufrechterhalten. Deren präparativer Pumpenkopf war mit einer Leistung von 50 ml/min ausgestattet. Die Steuerung lief über ein Gilson 802-Modul. Die Detektion der einzelnen Fraktionen erfolgte am Ende der Säule bei 220 nm mittels eines UV-Detektors (Holochrome, Gilson). Die HPLC-Fraktionen von je 5 ml wurden in einem Fraktionensammler (Super Frac, Pharmacia Biotech) aufgefangen. Es erfolgte eine Rekombination der Komponenten anhand der Retentionszeiten, der Farbe und der Fluoreszenz. Die Acetonitrilkomponente des Laufmittels in den Fraktionen wurde im Rotationsverdampfer entfernt. Die Pigmente fielen aufgrund ihrer Lipophilie in der verbleibenden Wasserphase aus. Diese konnte durch eine Gefriertrocknung entfernt werden.

Eine weitere Aufreinigung erfolgte durch einen erneuten HPLC-Durchlauf, wobei der Konzentrationsgradient flacher und entsprechend breiter gewählt wurde. Auch nach diesem zweiten Durchlauf wurden einige Proben wieder vereinigt und erneut gefriergetrocknet. Im nächsten Schritt wurde eine Teilprobe der so ermittelten Fraktionen zur analytischen HPLC verwendet.

3.1.6.2 Analytische HPLC

In der analytischen HPLC wurden Bruchteile der zuvor in der präparativen HPLC gewonnenen Fraktionen auf ihre Reinheit untersucht. Die stationäre Phase bestand ebenfalls aus einer unpolaren reversed-Phase-Säule (RP-18, 4 × 250 mm, stationäre Phase Shandon ODS Hypersil 3 µm, Life Science International LTD, Cheshire, England). Als mobile Phase wurde ein Acetonitril-Wasser-Gemisch verwendet, wobei die Flussrate 1 ml/min betrug. Im zeitlichen Verlauf der reversed-Phase-HPLC nahm der Wassergehalt des Gemisches ab (linearer Gradient von 100–0% Wasser bzw. 0–100% Acetonitril über 100 min). Die Retentionszeiten der Bestandteile konnten somit über den Wasseranteil des Eluenten gesteuert werden. Da dieser zu Beginn der HPLC bei 100% lag, verblieben die lipophilen Substanzen länger auf der Säule als die hydrophilen. Der Aufbau des Gradienten erfolgte mittels Hochdruck (Gynkotek Gradientenpumpe 480, Gynkotek, Germering). Um einen optimalen Probenauftrag zu gewährleisten, wurden Autosampler (Alcott Modell 738, Bischoff Analysentechnik, Leonberg) mit einem Volumen von 100 µl verwendet. Am Ende der Säule erfolgte die Detektion der Fraktionen bei 220 nm (UV-Detektor 785, bai, Bensheim).

3.2 Phagozytose

3.2.1 Verwendete *Exophiala*-Isolate

Allen Untersuchungen dieser Arbeit liegen ausschließlich der Wildtyp (ATTC No. 34100) und dessen Melaninmangelmutante Mel-3 (ATCC No. 44504) des Pilzes *Exophiala dermatitidis* zugrunde (**Tabelle 1**).

3.2.2 Anzucht und Kultur

Da die Hefekulturen möglichst frisch zum Ansatz hinzugegeben werden müssen, wurden sie mit einer sterilen Öse dünn auf eine Selektivplatte für pathogene Pilze (SPF, Merck, Darmstadt) ausgebracht und für maximal sechs Tage bei 32°C im Brutschrank inkubiert. Hier wurde zur weiteren Kultur das bereits von Peltroche-Llacsahuanga et al. (2003) verwendete Flüssigmedium für Hefen eingesetzt. Da dem Flüssigmedium reichlich Yeast extract zugesetzt ist, wird das Wachstum des dimorphen Pilzes in der für den Versuch erwünschten Hefeform begünstigt. Für die späteren Messungen am Durchflusszytometer ist die Vereinheitlichung des Pilzwachstums über Kultivierung in diesem Medium essentiell. Yeast Nitrogen Base liefert dabei zahlreiche Stickstoffquellen für die Hefen. Glucose dient als Energielieferant, MOPS acid und –salz stellen Puffersubstanzen dar. Die genaue Zusammensetzung ist **Tabelle 5** zu entnehmen. Die Herstellung erfolgte eigenständig im Labor.

Tabelle 5: Inhaltsstoffe des Flüssigmediums

Inhaltsstoff	Menge (g)	Hersteller
Yeast extract	50	DIFCO, Michigan
D (+) Glucose	10	Merck, Darmstadt
MOPS-Salz	17,26	Sigma- Aldrich
Yeast Nitrogen Base	6,7	Sigma- Aldrich
MOPS-Acid	1,91	Roth, Karlsruhe
Aqua dest.	Ad 1l	B.Braun, Melsungen

Mit einer Pipette wurden unter der Sterilbank je 5 ml des hergestellten Mediums pro Vertiefung in eine 6-Well-Platte (Tissue Culture Plate, 6 Well, Flat Bottom, Falcon) überführt. Jedes Well wurde mittels steriler Öse mit einer Einzelkolonie des zu untersuchenden *Exophiala dermatitidis*-Stammes beimpft. Anschließend wurde die mit einem Deckel verschlossene Platte über drei Tage bei 32°C in einem Wasserschüttelbad (GFL 1092) bei 112 Upm inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte eine Filtration des bewachsenen Mediums mittels eines Siebes (Cell Strainer, 40 µm, BD- Falcon) in 50 ml-PP-Röhrchen (BD, Falcon). Dieser Vorgang diente der Gewinnung von einzelnen Hefezellen und der Vermeidung von Zellakkumulationen. Das Filtrat wurde vor der weiteren Bearbeitung zweimal bei Raumtemperatur zentrifugiert (3000 Upm, 5 min/ Rotiwa) und zur Beseitigung von Rückständen des Flüssigmediums mit je 10 ml NaCl-Lösung (B. Braun, Melsungen) gewaschen.

3.2.3 Präparation der Pigmente

Die Referenzstämme von *Exophiala dermatitidis* (**Tabelle 1**) wurden wie bereits in **Kapitel 3.1.2** besprochen auf einen Selektivagar für pathogene Pilze ausgestrichen. Nach entsprechender Inkubationszeit wurde der jeweilige Keim vier Wochen lang auf 1b-Agar bebrütet (**Kapitel 3.1.3**). 190 dieser Platten waren pro Stamm für die Gewinnung der Tryptophanpigmente verwertbar. Dabei basierte die darauffolgende Quantifizierung auf der Arbeit von Heidrich (2010). Das Volumen des gewonnenen Rohextraktes, der in Methanol gelöst wurde, betrug jeweils 15 ml. Aus diesem Gemisch wurden 5 ml entnommen und im Rotationsverdampfer getrocknet. Anschließend wurde es in 5 ml des Lösungsvermittlers DMSO aufgenommen und für die späteren Phagozytose-Versuchsreihen in 5 µl-Aliquots aufbewahrt.

Die restlichen 10 ml des Gemisches wurden via Säulenchromatographie aufgetrennt und die einzelnen Fraktionen in je 3 ml Methanol resuspendiert. Davon wurden je 2 ml für die weitere Aufreinigung der Pigmente der Dünnschichtchromatographie zugeführt, der verbleibende 1ml-Rest im Rotationsverdampfer abrotiert und in gleichen Teilen in DMSO gelöst. Jede DC-Fraktion wurde erneut in 1 ml Methanol aufgenommen und bis zu ihrer Zugabe in 3 µl-Aliquots tiefgefroren. Die hinsichtlich eines Einflusses auf die Phagozytose im Laufe der Versuche interessant erscheinenden Fraktionen wurden in einem weiteren Linomatendurchlauf auf 70 Kieselgelplatten à 500 µl aufgetragen. Nach deren Trocknung wurde die relevante Fraktion in fünf Banden unterteilt. Diese Banden wurden für die präparative HPLC ausgekratzt und anschließend in je 1 ml Methanol gelöst. Zu den Versuchansätzen wurden 3 µl-Aliquots gegeben.

Zur Darstellung des Oxidative Burst-Hemmstoffes „Anthrazit“ wurden die von den 1.000 1b-Agarplatten verwertbaren Nährböden nach erfolgter Inkubationszeit, wie bereits in **Kapitel 3.1.3** beschrieben, aufgearbeitet. Die Ausbeute des Rohextraktes betrug 75 ml. Dieser wurde ebenso säulen- und dünnschichtchromatographisch aufgereinigt und fraktioniert, wobei ausschließlich die anthrazitfarbene Bande auf den DC-Platten bearbeitet wurde. Das hierbei gewonnene, ausgekrazte DC-Material wurde zur weiteren chemischen Strukturanalyse an die Universität Göttingen zur Forschergruppe der DFG, AG Karlovsky, versendet.

3.2.4 Präparation der Zellen für den Messvorgang

3.2.4.1 Markierung der neutrophilen Granulozyten

Zur Identifizierung der einzelnen Leukozytenpopulationen wird in der Durchflusszytometrie von monoklonalen Antikörpern Gebrauch gemacht. Da in der vorliegenden Studie die neutrophilen Granulozyten von besonderem Interesse waren, wurden diese für die jeweilige Versuchsreihe mit einem APC-konjugierten, monoklonalen CD 16+-Antikörper (BD) markiert. Das Fluorochrom APC wird bei 650 nm angeregt, dessen Emissionsmaximum liegt bei 660 nm. Dem vorab bereits lysierten Vollblutansatz wurde je 2,5 µl des Antikörpers (Konzentration 0,02 mg/ml) zugegeben und 15 Minuten lichtgeschützt auf Eis inkubiert. Um überschüssige bzw. nicht gebundene Antikörper zu entfernen, wurde anschließend mit 3 ml PBS bei 1000 Upm 5 Minuten lang gewaschen (Hettich, Rotixa/AP). Zur Messung am Durchflusszytometer wurden die Zellen in 300 µl PBS aufgenommen und auf Eis verbracht.

3.2.4.2 Markierung der Hefezellen

BCECF-AM diene als Fluorochrom für die *Exophiala dermatitidis*-Zellen, da es bereits in verschiedenen Studien erfolgreich zur Anfärbung der Hefen eingesetzt wurde (Schnitzler et al. 1999; Peltroche-Llacsahuanga et al. 2003; Heidrich 2010). Dabei wird das in seiner Ausgangsform nicht fluoreszierende BCECF-AM (Invitrogen) in vitalen Zellen mittels intrazellulärer Esterasen zum aktiven Farbstoff BCECF umgebaut und kann in dieser Form die Zelle nicht mehr verlassen. Die grüne Fluoreszenz besitzt ein Emissionsmaximum von 535 nm, das Absorptionsmaximum liegt bei 505 nm. Gemäß den Herstellerinformationen wurde das Lyophilisat (1 mg) in 1,6 ml DMSO (Sigma-Aldrich) gelöst und den Pilzzellen in einer Konzentration von 1 µmol/l zugesetzt, gefolgt von einer 30-minütigen Inkubation bei 37°C im Wasserschüttelbad, um eine ausreichende Anfärbung der Hefen zu gewährleisten. Zur Beseitigung von Rückständen des Farbstoffes, wurden die gefärbten Pilze anschließend

zweimal mit je 5 ml PBS bei 3.000 Upm gewaschen. Ziel dieser Zellmarkierung war es, sie am Durchflusszytometer deutlich von den Granulozyten unterscheiden und jederzeit detektieren zu können.

3.2.5 Versuchsaufbau

Die gewaschenen Hefezellen von *Exophiala dermatitidis*-Wildtyp und dessen Melaninmangelmutante Mel-3 wurden zunächst auf Eis einer zweiminütigen Ultraschallbehandlung (VibraCell 75022) bei halbmaximaler Energie unterzogen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (3000 Upm für 5 min) wurden die Zellen in 1 ml PBS aufgenommen. Mit Hilfe einer modifizierten Neubauerzählkammer wurden unter dem Mikroskop 5×10^6 Hefezellen ausgezählt, um ein optimales Pilz-/Granulozytenverhältnis bei den Versuchen zu gewährleisten. Die Anfärbung erfolgte, wie in **Kapitel 3.2.4.2** beschrieben.

Das frisch entnommene Blut stammte von gesunden Spendern im Alter von 20 bis 50 Jahren, das im Rahmen der Tagesspende des Instituts für Klinische Immunologie und Transplantationsmedizin der JLU Gießen gewonnen wurde. Die Einwilligung der Spender zur Verwendung ihres Blutes zu Forschungszwecken wurde über deren Unterschrift eingeholt und ist am Institut hinterlegt. Für die Versuche wurde ausschließlich heparinisiertes Vollblut (Endkonzentration Heparin: 10 I.E.) verwendet. Nach mehreren Titrations- und Kinetikmessreihen wurden die Hauptversuche mit 100 µl Vollblut pro Ansatz durchgeführt. Dafür wurde das gut durchgemischte Heparinblut mit einer Pipette in 2 ml-Eppendorfgefäße überführt und während der Inkubation mit den Hefezellen in einem Thermomixer (Eppendorf, Thermomixer comfort, MTP) bei 37° C geschwenkt. Deren Zugabe erfolgte in Form von 10 µl BCECF-gefärbter Hefen (entspricht 5×10^6 Hefezellen) zu dem jeweiligen Ansatz. Zu unterschiedlichen Zeitstufen wurde der nochmals gut gemischte Inhalt der Eppendortubes in jeweils identisch beschriftete FACS-Röhrchen transferiert und sofort auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 3 ml frisch hergestellten Lysepuffers (Lysisbuffer, 10x concentrate, BD) pro Röhrchen wurde abermals gut gemischt. Ziel war eine Lyse der Erythrozyten, die bei den Messungen keine Rolle spielen bzw. eher stören. Gleichzeitig wird durch das im Lysepuffer enthaltene Formaldehyd auch eine Fixierung der Granulozyten erreicht, was einen exakten Abbruch zu den unterschiedlichen Inkubationszeiten (0-10-30-60 Minuten) ermöglicht. Zudem unterbindet die Aufbewahrung der Ansätze auf Eis ein Fortschreiten physiologischer Zellprozesse. Nach 15-minütiger Inkubation mit dem Puffer auf Eis wurden die Röhrchen bei 1150 Upm 5 Minuten lang zentrifugiert und anschließend zweimal mit je 3 ml kalter PBS gewaschen. Die dekantierten Proben wurden daraufhin entsprechend **Kapitel 3.2.4.1** mit dem Antikörper markiert. Der Färbeschritt erfolgte deshalb erst zum Schluss, da die

Temperatur von 37°C, die der Simulation von *in vivo*-Verhältnissen diene, mit dem konjugierten Antikörper nicht kompatibel ist. Außerdem vermag der hier verwendete Klon 3G8, die Phagozytose neutrophiler Granulozyten im Vorfeld zu blockieren, was in dieser Studie kontraindiziert wäre.

Die Pigmente wurden den Versuchsreihen in Form von in DMSO gelöstem Rohextrakt, der einzelnen säulenchromatographisch aufgetrennten Fraktionen, wie auch der daraus gewonnenen, in Methanol gelösten, dünnstichtchromatographischen Banden zugesetzt. Deren Zusatz zum Vollblut-Pilzgemisch erfolgte meist nach 0, 30 und 60 Minuten, um einen eventuell kinetischen Verlauf ihrer Wirkung feststellen zu können. Nach mehreren Titrationsversuchen wurde zu jeder Zeitstufe stets 3 µl des jeweiligen Pigmentes zugegeben und anschließend analog, wie oben beschrieben, damit verfahren.

Pro Versuchsreihe diene stets ein doppelter Ansatz ohne jegliche Zugabe von Pigmenten, also nur mit Vollblut und zugesetztem Pilz, zu den jeweiligen Zeitstufen als Kontrollansatz. Dies ermöglichte die Feststellung, ob eventuell allein die Tryptophanderivate einen Einfluss auf die Phagozytose ausübten.

Als Negativkontrolle diene ein Vollblutansatz, dem in gleicher Menge (100µl) vierprozentiges Paraformaldehyd (pH: 7,07) zugesetzt wurde. So wurde die Aktivität der Granulozyten bereits vor Zugabe der gefärbten Hefezellen unterbunden und damit deren Phagozytosefähigkeit unmöglich. Alle Ansätze wurden in 300 µl PBS in ein FACS-Röhrchen aufgenommen und für maximal 30 Minuten lichtgeschützt auf Eis bis zur schlussendlichen Messung am Durchflusszytometer aufbewahrt.

3.3 Durchflusszytometrie

3.3.1 Allgemeines Prinzip

Die Durchflusszytometrie basiert im Wesentlichen auf dem Prinzip der simultanen Messung und Analyse von optischen Signalen, die beim Durchfluss eines Partikels durch einen Lichtstrahl entstehen. Dabei spielen Fluoreszenz und Lichtstreuung die zentrale Rolle. Als Fluoreszenz bezeichnet man die überwiegend schnell abklingende Lichtemission von Molekülen nach erfolgter Absorption von energiereicherer Strahlung. Dieser physikalische Prozess wird durch Licht einer bestimmten, für eine Substanz charakteristischen Wellenlänge photometrisch angeregt. Viele Substanzen zeigen eine schwache Autofluoreszenz, die auch als primäre Fluoreszenz bezeichnet wird. In der Durchflusszytometrie wird jedoch die Sekundärfluoreszenz genutzt, die aus der Anlagerung spezifischer Fluorochrome an die Substanzen resultiert. Durch die absorbierte Lichtenergie dieser fluoreszierenden Verbindungen werden bestimmte Elektronen kurzzeitig auf ein höheres Energieniveau angehoben. Bei der Rückkehr zum Grundniveau emittiert das angeregte Elektron ein Photon. Das emittierte Licht (Emissionsspektrum) besitzt dabei aufgrund von Wärmeverlust stets eine niedrigere Energie und ist somit langwelliger als das absorbierte Licht.

Die Durchflusszytometrie bedient sich des Weiteren der Messung von Streulicht. Unter Streuung versteht man in der Physik eine Richtungsänderung der Primärstrahlung beim Durchgang durch Materie bedingt durch diverse Wechselwirkungen. Trifft ein Lichtstrahl beispielsweise auf eine Zelle, wird dieser in unterschiedlichem Maß gestreut. Dabei wird die Lichtstreuung von physikalischen Eigenschaften der Zelle, wie deren Größe bzw. Querschnittsfläche, der Membranstruktur und den intrazellulären Bestandteilen (Granula, Vakuolen) beeinflusst. Es handelt sich dabei um eine unelastische Streuung, d.h. ein Teil der kinetischen Energie geht in Form von Wärme verloren. Außerdem wird das Licht nicht in alle Richtungen gleichmäßig gestreut. Je kleiner der Winkelbereich ($0-10^\circ$) des einfallenden Lichtstrahls (Vorwärtstreulicht, Forward-Scatter-Light FSC) ist, desto größer ist dessen Streuung. Zusätzlich wird ein geringer Teil des Lichts im 90° -Winkel dazu seitwärts gestreut (Seitwärtstreulicht, Sideward-Scatter-Light SSC). Dabei ist das Vorwärtstreulicht maßgeblich von der Größe der Zelle, das Seitwärtstreulicht hingegen von deren Granularität und Oberflächenbeschaffenheit abhängig.

3.3.2 Verwendetes Messgerät

(Quelle: BD FACSCanto II Trainingshandbuch (2007), BD Biosciences, Heidelberg)

Mit freundlicher Genehmigung des Instituts für Klinische Immunologie und Transplantationsmedizin der JLU Gießen konnte das Durchflusszytometer BD FACSCanto II (Becton Dickinson, Heidelberg) als Messgerät genutzt werden. Es dient unter anderem der qualitativen und quantitativen Analyse von Leukozytensubpopulationen in Suspensionen von menschlichen Zellen. Erfasst werden können maximal acht Parameter: fünf Fluoreszenzkanäle, zwei Kanäle für Vorwärts- und Seitwärtsstreuung. Eine spezielle Software (BD FACSDiva™) beinhaltet sämtliche Anwendungen, die für die Erfassung und Analyse digitaler Daten aus dem Durchflusszytometer erforderlich sind. Über eine Benutzeroberfläche wird eine zentrale Datenverarbeitung ermöglicht. Die Gerätesteuerung und die Datenerfassung sind in der Software integriert.

Das Durchflusszytometer besteht aus drei Subsystemen: dem Flüssigkeitssystem, der Optik und der Elektronik.

3.3.2.1 Flüssigkeitssystem

Dieses setzt sich aus Probeninjektionsröhrchen (Sample Injection Tube= SIT), dem Aspiratorarm, der Durchflusszelle, einem unter Druck stehenden innen liegenden Reservoir und einem Schlauchsystem zusammen (**Abbildung 10**). Letzteres versorgt die Durchflusszelle mit Mantel- und Reinigungsflüssigkeit und leitet gleichzeitig den Abfall ab. Wird nun ein Röhrchen auf das Probeninjektionsröhrchen montiert, baut eine Pumpe im Flüssigkeitssystem einen Druck im innen liegenden Plenum auf, das die Durchflusszelle mit Mantelflüssigkeit versorgt. Gleichzeitig wird das Probenröhrchen unter Druck gesetzt und dessen Inhalt durch das SIT nach oben und von dort in die Durchflusszelle gedrückt. Wird das Röhrchen demontiert, reinigt das Zytometer das SIT, indem Innen- und Außenseite des Röhrchens mit Trägerflüssigkeit gespült werden. Anschließend wird die Spülflüssigkeit vom Aspiratorarm abgesaugt.

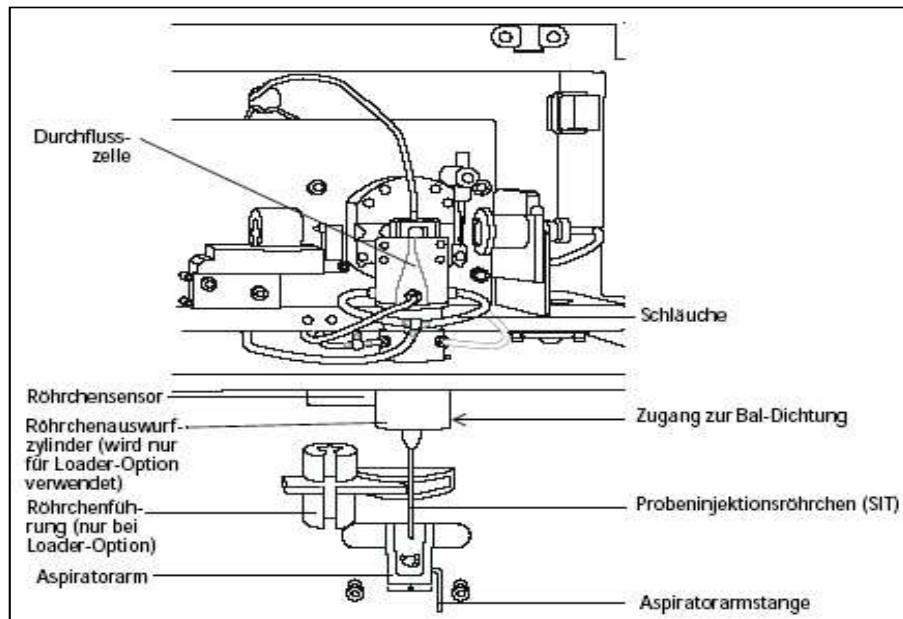


Abbildung 10: Flüssigkeitssystem des FACSCanto II (BD FACSCanto II, Trainingshandbuch 2007)

3.3.2.2 Komponenten und Funktionen des optischen Systems

Sobald die Probenflüssigkeit in die Durchflusszelle (Messküvette) gelangt, passieren die fluoreszenzmarkierten Partikel einzeln nacheinander die installierten Laserstrahlen. Das von diesen Partikeln gestreute und emittierte Licht liefert Informationen über deren Größe, Form bzw. Granularität und Fluoreszenzeigenschaften. Es wird zwischen Anregungs- und Erfassungsoptik unterschieden. Die Anregungsoptik besteht aus Komponenten, die Laserlicht vom Argonlaser in die Durchflusszelle leiten. Sie stellt also die Lichtquelle dar. Zunächst fällt das Laserlicht aus Glasfaserkabeln auf strahlformende Prismen. Von dort gelangt das gebündelte Licht zu einer achromatischen Fokussierungslinse. Die Linse lenkt das Laserlicht auf den Probenflüssigkeitsstrom in der Durchflusszelle. Wird die Zugangsklappe der Durchflusszelle geöffnet, blockiert eine Lichtfalle den Laserstrahl und unterbricht den Strahlengang (**Abbildung 11**).

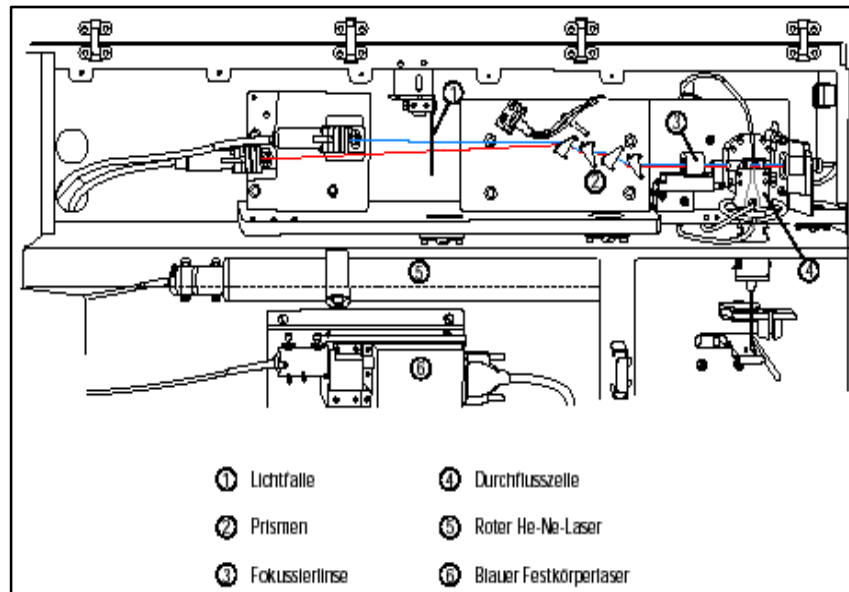


Abbildung 11: Strahlengang in der Optik (BD FACSCanto II, Trainingshandbuch 2007)

Der Detektionsteil, der aus mehreren Baugruppen zusammengesetzt ist, stellt die Erfassungsoptik dar. Diese besteht aus Photomultiplier-Röhren (PMTs), die bei diesem Gerät als ein Octagon und zwei Trignons angeordnet sind. Bei der optischen 4-2-2-Konfiguration enthält das Octagon fünf und die beiden Trignons je zwei Photomultiplier-Röhren (**Abbildung 12**). Die eine erfasst das vom 633 nm-Laser (rot) emittierte Licht, die andere das vom 405 nm-Laser (violett). Tritt das Licht in einen der Detektorarrays, lässt ein dichroischer Kurzpass- bzw. Tiefpassspiegel aus speziell bedampftem Glas die höchsten Wellenlängen zur ersten Photomultiplier-Röhre durch. Niedrigere Wellenlängen werden zur nächsten reflektiert. Analog dazu lässt deren dichroischer Kurzpassspiegel die nächsthöheren Wellenlängen durch und reflektiert niedrigere Wellenlängen. Dieses Prinzip gilt auch für die nachfolgenden PMTs. Unerwünschte Lichtanteile werden nochmals durch einen Bandpassfilter vor jeder PMT eliminiert. Die stärkeren Signale des Vorwärtstreulichts werden zusätzlich von einer Fotodiode erfasst. Die integrierte Verdunklungsblende verhindert, dass übermäßig viel Laserlicht auf diese Diode trifft.

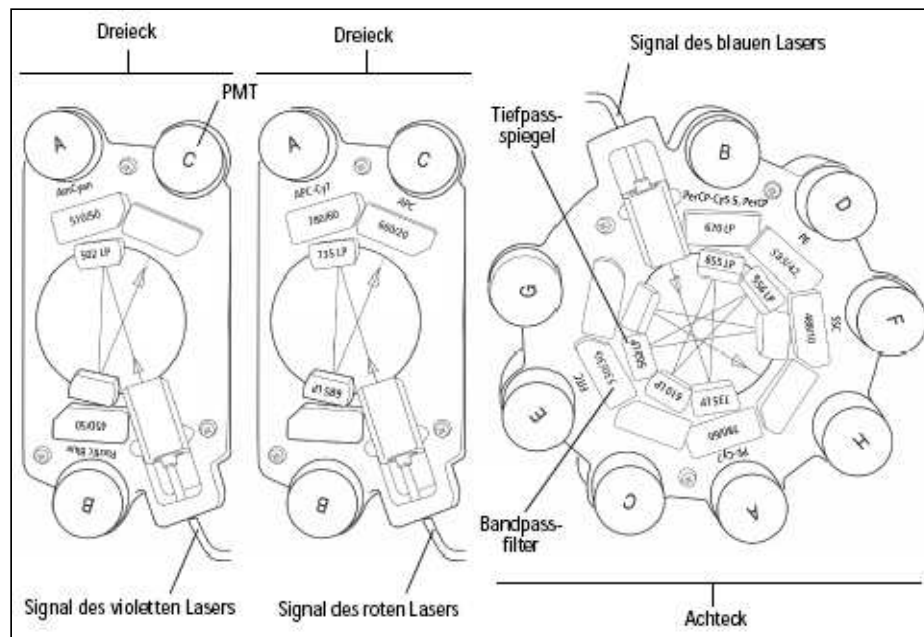


Abbildung 12: Die 4-2-2-Konfiguration (ein Octagon, zwei Trigons) (BD FACSCanto II, Trainingshandbuch 2007)

Tabelle 6 gibt einen Überblick über die verschiedenen optischen Filter in der oben angeführten Konfiguration des Durchflusszytometers. Anschließend wird noch explizit auf die in dieser Studie verwendeten Messkanäle eingegangen.

Tabelle 6: Optische Filter der 4-2-2-Konfiguration

Detektorarray (Laser)	PMT Position	Tiefpassspiegel	Bandpassfilter oder Tiefpassspiegel	Vorgesehener Farbstoff
Achteck (blauer Laser, 488 nm)	A	735	780/60	PE-Cy7
	B	655	670	PerCP-Cy5.5 oder PerCP
	C	610	Unbestückter Optikhalter	–
	D	556	585/42	PE
	E	502	530/30	FITC
	F	Unbestückter Optikhalter	488/10 und Lochblende	SSC
	G	Unbestückter Optikhalter	Unbestückter Optikhalter	–
	H	–	Unbestückter Optikhalter	–
Dreieck (roter Laser, 633 nm)	A	735	780/60	APC-Cy7
	B	685	Unbestückter Optikhalter	–
	C	–	660/20	APC
Dreieck (violetter Laser, 405 nm)	A	502	510/50	AmCyan
	B	Unbestückter Optikhalter	450/50	Pacific Blue™
	C	–	Unbestückter Optikhalter	–

Anregungsoptik

Optische Plattform

Strahlengeometrie (alle Laser)

Feststehende Optik

elliptischer Strahl 9 µm x 65 µm

Emissionsoptik

Sammellinse

Optisches Gel – gekoppelt an die
Durchflusszelle

Nummerische Apertur (NA) = 1,2

Fluoreszenzmessung

6 bis 8 Photomultiplier-Detektoren:

Vom 488-nm-Laser gemessene
Wellenlängenbereiche:

- 750–810 nm (PE-Cy7)
- 670–735 nm (PerCP-Cy5.5)
- 610–637 nm (PE-Texas Red[®], optional)
- 564–606 nm (PE)
- 515–545 nm (FITC) → Kanal für BCECF

Vom 633-nm-Laser gemessene
Wellenlängenbereiche:

- 750–810 nm (APC-Cy7)
- 701–723 nm (Alexa Fluor[®] 700, optional)
- 650–670 nm (APC) → Kanal für CD16⁺-
APC

Vom 405-nm-Laser gemessene
Wellenlängenbereiche:

- 502–535 nm (AmCyan)
- 425–475 nm (Pacific Blue[™])

Detektion der Vorwärtsstreuung

Fotodiode mit 488/10-Bandpass-Filter

Detektion der Seitwärtsstreuung

PMT mit 488/10-Bandpass-Filter

3.3.2.3 Elektronik

Das Elektroniksystem wandelt optische Signale in elektrische um. Diese werden anschließend digitalisiert, sodass sie mithilfe eines Computers analysiert werden können. Die von der Fotodiode und den PMTs generierten Signale sind proportional zur eingegangenen Lichtmenge. Wird also das geradlinig verlaufende Laserlicht unterbrochen, spricht man von einem „event“. Dessen Ausmaß wird in Volt gemessen. Die integrierte Elektronik des Zytometers verstärkt die Signale und wandelt sie von stetigen, also analogen, Spannungswerten in diskrete, digitale numerische Werte um. Nach der Verstärkung und Digitalisierung lassen sich die Fluoreszenzlichtsignale von gleichartig präparierten und gefärbten Partikeln eindeutig Kanälen zuordnen, sodass deren Analyse möglich ist.

3.3.3 Messung am Durchflusszytometer

Zur Messung der Phagozytose wurden die Zellen von *Exophiala dermatitidis* mit dem grünen Fluoreszenzfarbstoff BCECF angefärbt, um eine klare Abgrenzung zu den CD16⁺-APC-markierten Granulozyten vornehmen zu können, die im roten Bereich emittieren. Der zeitliche Rahmen zwischen Anfärbung und Messung wurde mit zwei Stunden recht eng gewählt, um mögliche Veränderungen der Zellen weitestgehend auszuschließen. Die in 300 µl PBS suspendierten Granulozyten und Pilzzellen befanden sich zur Messung am oben beschriebenen Durchflusszytometer in 5 ml-FACS-Röhrchen (Sarstedt, Nümbrecht, 75x12 mm PS).

Jedes einzelne Probenröhrchen einer Messreihe wurde unmittelbar vor der Messung gut homogenisiert (Vortexer, VWR international). Es wurden jeweils immer 50.000 Zellen, sogenannte „events“, registriert, um die Ergebnisse miteinander vergleichen zu können. Die Verstärkereinstellungen des FACSCanto II wurden für die Streulichtsignale linear, für die Fluoreszenzintensitäten hingegen logarithmisch gewählt.

3.3.4 Auswertung

Die graphische Auswertung der Versuchsreihen wurde anhand von Dotplot-Darstellungen vorgenommen, in denen zunächst als Parameter für die Zellgröße die Vorwärtsstreuung (FSC) gegen die Seitwärtsstreuung (SSC) als Parameter für deren Granularität aufgetragen wurde. Es handelt sich dabei um eine korrelierte Zweiparameterdarstellung, bei der die Relation zweier unterschiedlicher Eigenschaften einer Zelle zueinander angezeigt wird. Dieses wird als Dotplot (Zweiparameter-Punkthistogramm) bezeichnet. Jeder Punkt stellt für mindestens eine bestimmte Zelle ihre beiden gemessenen Parameter dar.

Abbildung 13 zeigt Leukozyten nach erfolgter Erythrozytenlyse, die sich anhand ihrer Größe (FSC, Abszisse) und ihrer Granularität (SSC, Ordinate) verteilen. Auf diese Weise kann eine Unterteilung der Leukozyten vorgenommen werden: Große, granulierte Zellen entsprechen den Granulozyten (**4**), die deutlich von den großen, aber wenig granulierten Monozyten (**2**) unterschieden werden können. Die kleinen, kaum granulierten Lymphozyten (**3**) lassen sich gegenüber Zelltrümmern und Mikroorganismen (**1**) nochmals abgrenzen.

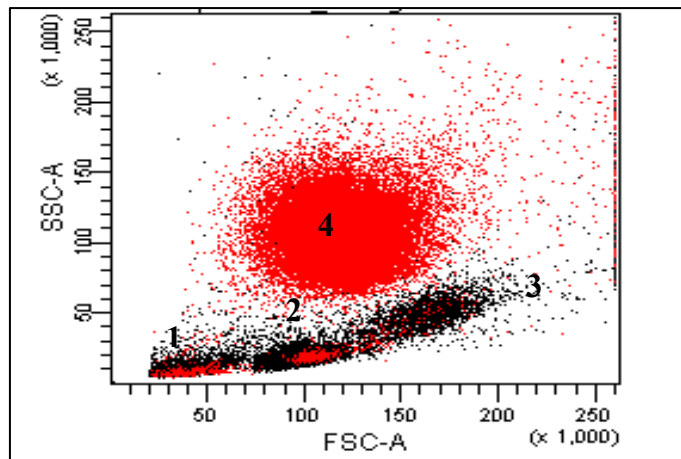


Abbildung 13: Lysiertes Vollblut in Dotplotdarstellung (rote Punktwolke: Granulozytengate, 1: Zelltrümmer; 2: Monozyten; 3: Lymphozyten; 4: Granulozyten)

Nach Auftragung der beiden Fluoreszenzen (APC und BCECF) gegeneinander konnte eine Einteilung in vier Quadranten erfolgen (**Abbildung 14**). Dabei wurde die Abzisse mit dem FITC-Kanal zur Messung der BCECF-gefärbten Pilze und die Ordinate mit dem APC-Kanal zur Darstellung der Granulozyten belegt.

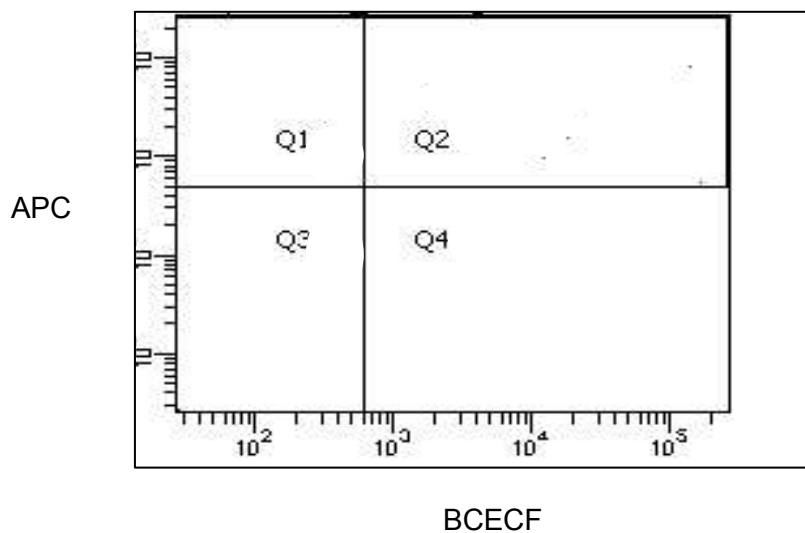


Abbildung 14: Einteilung des Dotplots in vier Quadranten (Q1–Q4)

Die CD16⁺-Granulozyten kamen so, ihrer Fluoreszenz entsprechend, stets im oberen linken Quadranten (Q1) zu liegen und waren damit eindeutig zuzuordnen.

Die gefärbten Hefezellen hingegen lagen stets im unteren rechten Quadranten (Q4), was auf ihre Markierung mit BCECF zurückzuführen ist. Demzufolge verschob sich das Bild bei erfolgreicher Phagozytose der Pilzzellen durch die neutrophilen Granulozyten. Die Granulozyten mit inkorporierten Hefen fielen in den oberen rechten Quadranten (Q2), da sie bezüglich der Fluoreszenzen nun „doppelt positiv“ - also auf beiden Fluoreszenzkanälen zu detektieren - waren. Mit Hilfe der FACSDiva-Software konnte am Durchflussszytometer der Prozentsatz der Zellen des oberen rechten Quadranten (Q2) berechnet werden.

3.3.5 Statistische Auswertung

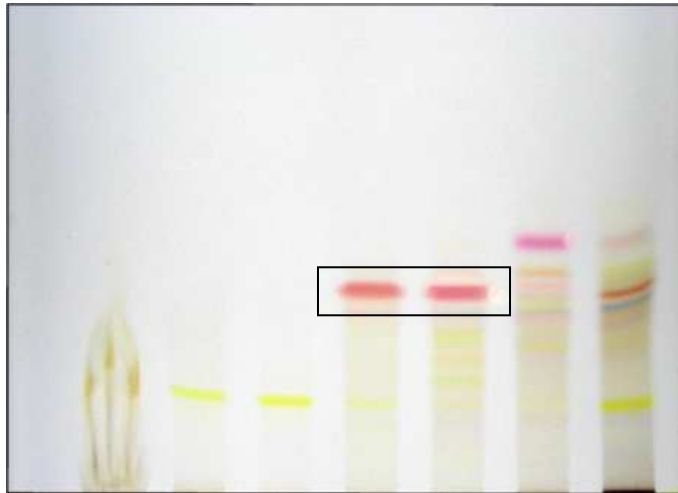
Der prozentuale Anteil der Zellen in Q2 der verschiedenen Messreihen wurde tabellarisch anhand von arithmetischem Mittelwert und Standardabweichung beschrieben. Der Vergleich der Versuchsreihen bzw. Zeitpunkte erfolgte mit einem linearen Regressionsmodell. Wenn Messwiederholungen verschiedener Blutproben analysiert wurden, was in der Regel der Fall war, wurde ein gemischtes Modell mit zufälligem Faktor Blutprobe zugrundegelegt. Graphisch wurden die einzelnen Messwerte, die Mittelwerte und bei mehr als zwei Messwiederholungen die Standardabweichungen der verschiedenen Versuchsbedingungen und Zeitpunkte dargestellt. Alle Tests erfolgten zweiseitig zum Signifikanzniveau 0.05. Aufgrund des explorativen Charakters dieser Studie wurde bei paarweisen Vergleichen (multiple Tests) nicht adjustiert. Die Daten wurden in Exceltabellen erfasst, deren Aufbereitung und Auswertung erfolgte mit Stata 11.1 Intercooled für Windows.

4 Ergebnisse

4.1 Von den Referenzstämmen zur Pigmentgewinnung

Wie **Tabelle 1** zu entnehmen, wurden zur Pigmentgewinnung ausschließlich der Wildtyp von *Exophiala dermatitidis* sowie seine Melaninmangelmutante Mel-3 verwendet. Der Farbumschlag des 1b-Mediums von nahezu farblos nach braun bereits nach wenigen Tagen Inkubation sprach für ein gutes Wachstum der jeweiligen Keime. Im Laufe der zweiwöchigen Inkubation intensivierte sich die Verfärbung stetig, was als Indikator für eine starke Pigmentinduktion gedeutet werden konnte. Von beiden Referenzstämmen konnten je 190 Platten zur weiteren Aufarbeitung genutzt werden. Mittels einer UV-Lampe konnte bei 366 nm bei allen Platten eine gelbe Fluoreszenz festgestellt werden, was ein weiteres Charakteristikum der darin enthaltenen Pigmente ist. Von den Platten konnten jeweils 15 ml Rohextrakt gewonnen werden, sodass von einer hohen Produktionsrate an Indolderivaten auszugehen war. Untermuert wurde diese Vermutung durch die gleichermaßen hohe Ausbeute bei den zusätzlich beimpften 1.000 1b-Platten, wovon 970 Stück verwertbar waren. Hier betrug das Rohextraktvolumen 75 ml (**Kapitel 3.2.3**).

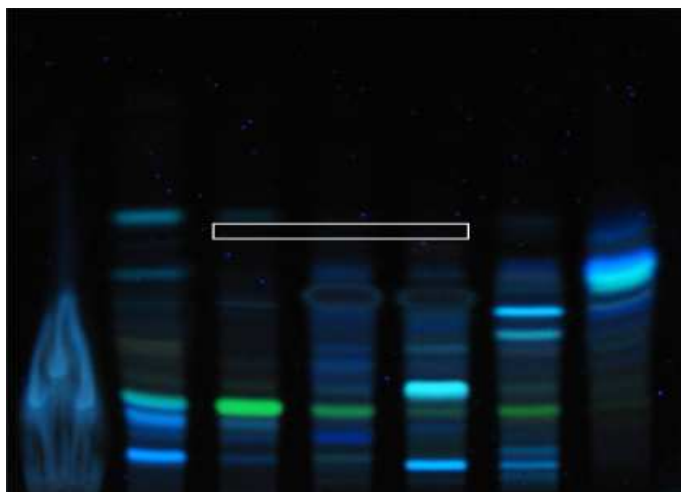
Auch die Beobachtung, dass sich die Stämme auf dem Mangelmedium weder qualitativ optisch noch quantitativ bezüglich des gebildeten Rohextraktes unterscheiden (Heidrich 2010), kann in dieser Arbeit bestätigt werden. Anders als bei der vorangegangenen Arbeit (5 Fraktionen) wurde der Rohextrakt des Wildtyps von *Exophiala dermatitidis* mittels Säulenchromatographie in sieben Fraktionen unterteilt (**Abbildung 15**). Die Fraktionierung unterliegt stark subjektiven Eindrücken. Wenn auch ein genauer Vergleich der daraus resultierenden DC-Platten mit denen der Vorgängerstudie anhand der R_F -Werte nicht möglich war, konnte doch über die farbliche Ausprägung auf das jeweilige Pigment rückgeschlossen werden.



Exophialin und Desoxyexophialin

Abbildung 15: Darstellung der sieben Säulenchromatographie-Fractionen des *E. dermatitidis*-Wildtyps bei Tageslicht in der DC

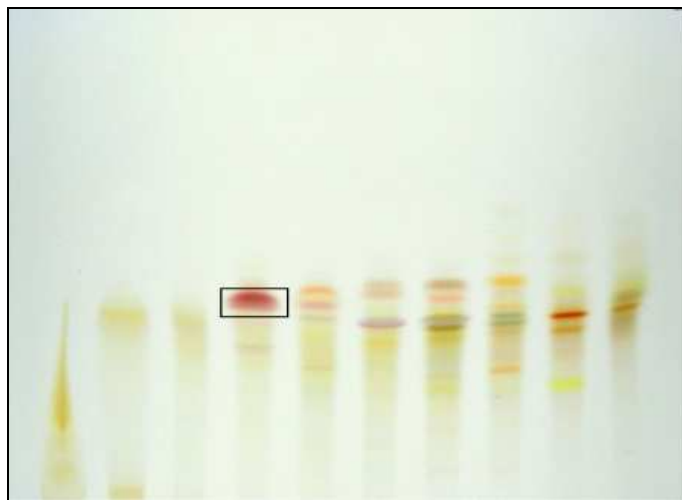
Auch ließen sich die farbintensiven Banden auf den Dünnschichtchromatographie-Platten reproduzieren, die ein breites Spektrum an Indolalkaloiden widerspiegeln (**Abbildung 15** und **16**). Pityriacitrin zeichnet sich durch UV-absorbierende Eigenschaften aus (schwarzes Erscheinungsbild im UV-Licht).



Pityriacitrin

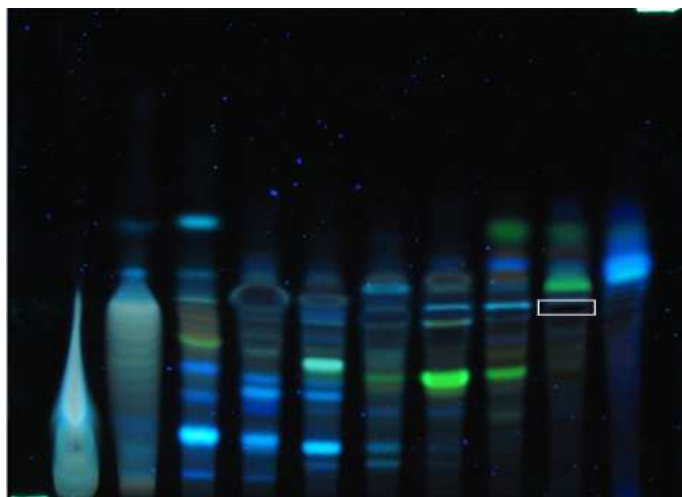
Abbildung 16: Darstellung der sieben Säulenchromatographie-Fractionen des *E. dermatitidis*-Wildtyps bei 366 nm mittels UV-Licht in der DC

Der Rohextrakt der Melaninmangelmutter Mel-3 wurde säulenchromatographisch ebenfalls anders fraktioniert. Auch hier wurden zwei Fraktionen mehr als bei Heidrich (2010) unterschieden. Einen Überblick über die zehn Fraktionen zeigt **Abbildung 17** bei Tageslicht, sowie **Abbildung 18** bei UV-Lichtbestrahlung bei einer Wellenlänge von 366 nm.



Exophialin

Abbildung 17: Darstellung der zehn Säulenchromatographie-Fractionen der *E.dermatitidis*-Mutante Mel-3 bei Tageslicht in der DC



Pityriacitrin

Abbildung 18: Darstellung der zehn Säulenchromatographie-Fractionen der *E.dermatitidis* Mutante Mel-3 mittels UV-Licht in der DC

4.2 Phagozytoseversuche

4.2.1 Markierung der Zellen

Wie bereits in **Kapitel 3.2.4.1** und **3.2.4.2** beschrieben, wurden sowohl die Granulozyten wie auch die Hefezellen der beiden *Exophiala dermatitidis*-Stämme mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Dies geschah im Falle der Pilze mit dem Fluoreszein-Ester BCECF-AM. Nach intrazellulärer enzymatischer Spaltung kann das umgesetzte BCECF die vitale Pilzzelle nicht mehr verlassen. Der Exzitationsbereich der gefärbten Pilze liegt im grünen Bereich und kann im Durchflusszytometer im FITC-Kanal gemessen werden.

Voraussetzung für eine gute Darstellung der Zellen in der Durchflusszytometrie ist eine optimale Anfärbung. Nach 30-minütiger Färbezeit bei 37° im Wasserbad zeigten beide Isolate eine stabile Fluoreszenz, die selbst einen Tag später noch im Durchflusszytometer zu detektieren war. Dies war essentiell, um eine ausreichende Fluoreszenzintensität selbst intragranulozytär gewährleisten zu können. Die folgenden Abbildungen (**Abbildung 19** und **Abbildung 20**) zeigen eine Einparameterdarstellung in Form von Histogrammen. Ihnen ist die erfolgreiche Anfärbung der Zellen zu entnehmen. Die Partikel werden nach relativen Werten eines Parameters (z.B. BCECF im FITC-Kanal; APC im APC-Kanal) sortiert (Darstellung auf der Abszisse) und gegen ihre Anzahl (Ordinate) aufgetragen.

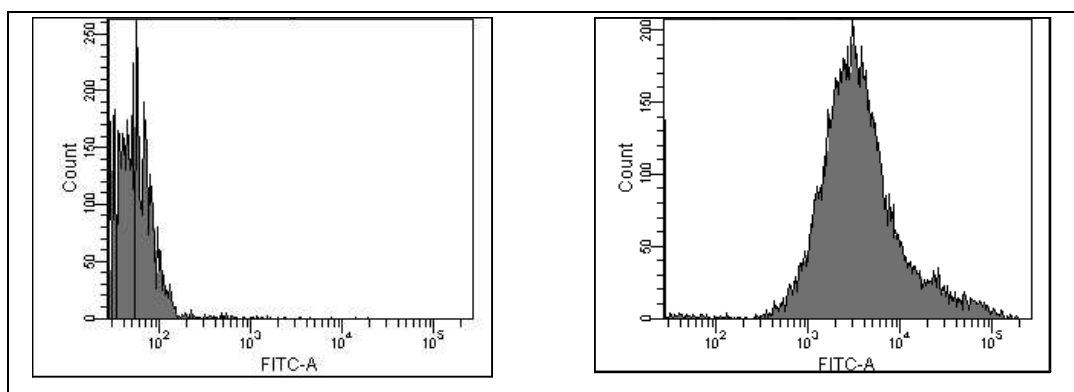


Abbildung 19: *Exophiala dermatitidis* Mel-3 ungefärbt (links) und nach erfolgreicher Anfärbung mit BCECF (rechts)

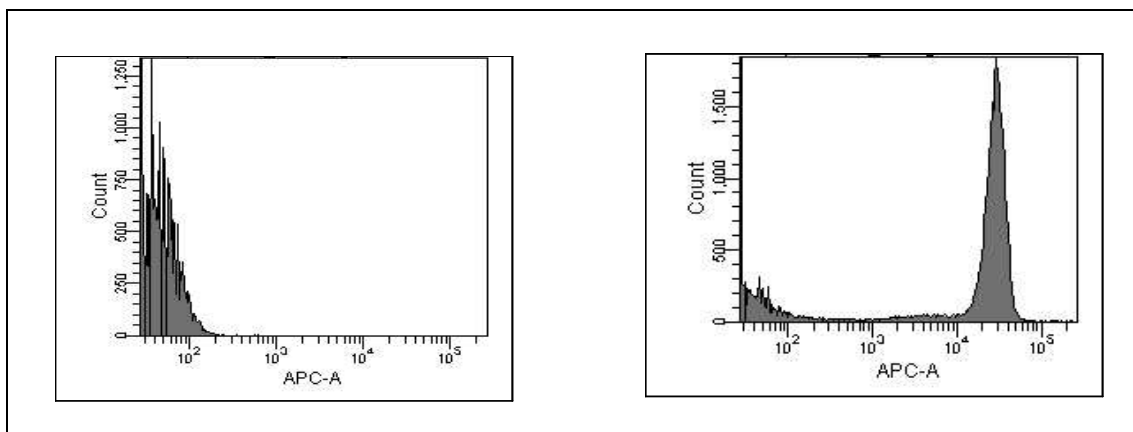


Abbildung 20: Histogramm von lysiertem, ungefärbtem Vollblut (links) und solchem mit APC-Markierung (rechts)

Die APC-Markierung der neutrophilen Granulozyten mit dem monoklonalen Antikörper konjugiert, erfolgte im Anschluss an die 60-minütige, mit dem Stoppen der Phagozytose beendeten Inkubationszeit. Bei jeder Versuchsreihe wurde als Garant für die erfolgreiche Anfärbung der beiden Zellgruppen jeweils ein Kontrollröhrchen mit BCECF-gefärbten Pilzen und eines mit APC-markierten Granulozyten mitgeführt.

Der *Exophiala*-Wildtyp ist durch Melanineinlagerungen in der Zellwand charakterisiert. Dies hat zum einen die Auswirkung, dass sich diese Hefezellen durch die abschirmende Wirkung des Melanins nicht so effizient anfärben lassen, wie die der melanindefizienten Mutante. Zum anderen wirkt sich dieser Effekt auch protektiv auf die Phagozytose (Schnitzler et al. 1999) wie auch auf den Oxidative Burst aus (Heidrich 2010). In einem einmaligen Phagozytose-Vorversuch wurden die beiden Referenzstämme gegenübergestellt. Bereits nach 20-minütiger Inkubationszeit deutete sich ein Unterschied zwischen der Mutante Mel-3 und dem melaninhaltigen Wildtyp an. In **Abbildung 21** ist links der *E.dermatitidis* Wildtyp nach 20 Minuten Inkubation zu sehen. Der prozentuale Anteil in Q2-1 beträgt nur 67,6%. Rechts wird die *E.dermatitidis* Mangelmutante Mel-3 nach gleicher Inkubationszeit demonstriert. Hier beträgt der Anteil der Zellen in Q2-1 87,7 %.

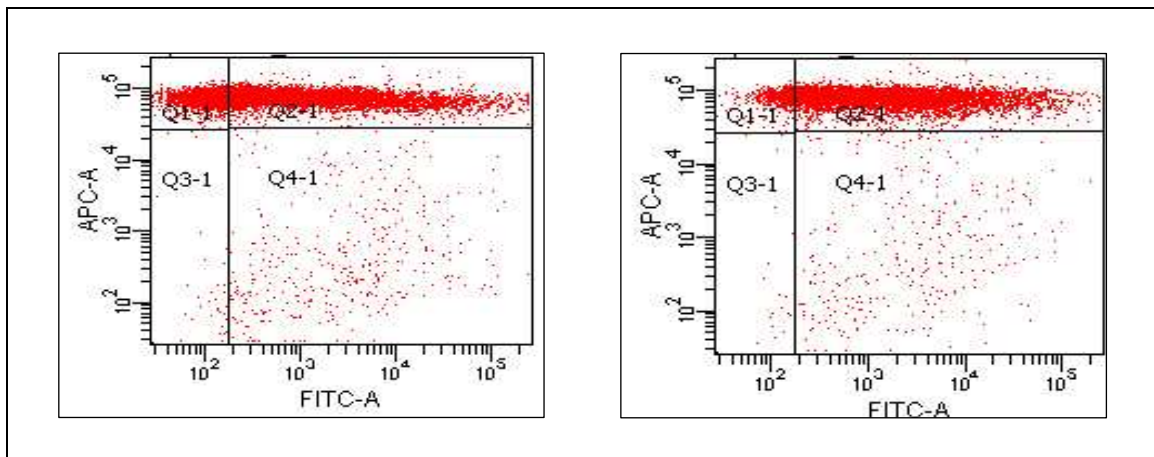


Abbildung 21: Darstellung des Schutzes von Melanin vor der Phagozytose: *Exophiala dermatitidis* Wildtyp (links) mit deutlich weniger Zellen in Q2-1 als Mel-3 (rechts); Inkubationszeit je 20 Minuten

Aufgrund der Tendenz des Wildtyps, schon per se Einfluss auf die Phagozytose zu nehmen und wegen des besseren Anfärbeverhaltens der Mutante Mel-3 wurde in den anschließenden Versuchen ausschließlich Mel-3 verwendet.

4.2.2 Auswertungsmodalitäten am Durchflusszytometer

Da der untersuchte Schwärzepilz *Exophiala dermatitidis* den Granulozyten hinsichtlich der Granularität sowie der Größe - durch Bildung von Aggregaten - ähnelt, ist deren Unterscheidung im Durchflusszytometer nur anhand dieser beiden Parameter nicht möglich. Deshalb erschien eine Auftragung von Vorwärts- (Größe) gegen Seitwärtsstreuung (Granularität) nicht sinnvoll (**Abbildung 22**).

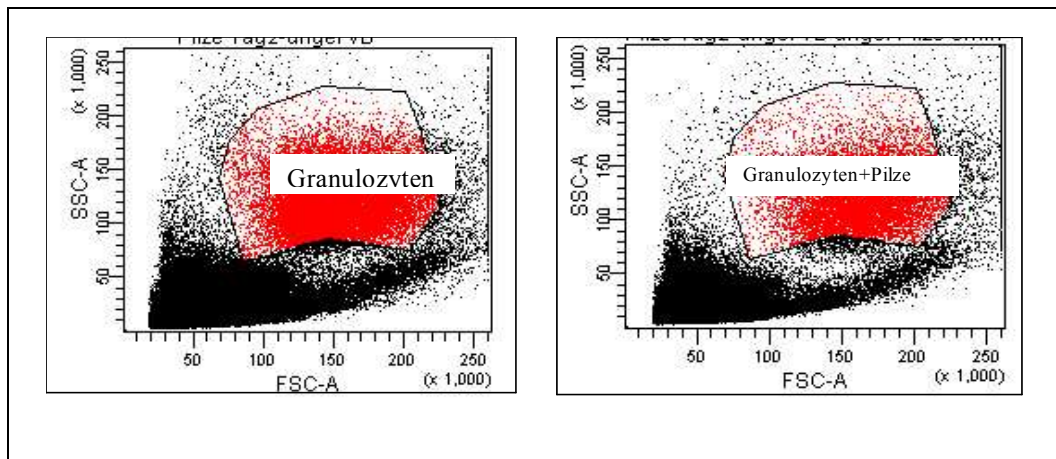


Abbildung 22: Ungefärbtes Vollblut (links) und mit Zusatz der Mutante Mel-3 (rechts)

Des Weiteren konnten durch alleiniges Anfärben der Pilze keine zufriedenstellenden Ergebnisse erzielt werden, da sie stets im Auswertfenster (Gate) der Granulozyten erschienen. So stellte auch die Dotplotdarstellung, in der die Abszisse die Granularität (SSC) und die Ordinate die Grünfluoreszenz der Pilze (FL-1) beinhaltete, ebenfalls keine adäquate Visualisierungsform der Phagozytose dar (Heidrich 2010). Die gleichzeitige Markierung der Granulozyten mit einem fluorochrombestückten, monoklonalen Antikörper nach erfolgter Phagozytose erschien logisch. Dabei wurde darauf geachtet, dass sich die Emissionsspektren der Fluorochrome nicht überlappen. In der vorliegenden Studie wurden zur Auswertung der Ergebnisse Dotplots herangezogen, in denen die beiden Fluoreszenzspektren gegeneinander aufgetragen wurden.

Einerseits war so eine reproduzierbare Zuweisung der jeweiligen Zellen in einen definierten Quadranten und andererseits eine Quantifizierung der Ereignisse anhand der sich vermischenden Fluoreszenzen möglich.

Die ungefärbten Pilzzellen befanden sich - ebenso wie die ungefärbten Granulozyten - im unteren linken Quadranten (Q3) (**Abbildung 23**). Nach erfolgreicher Markierung mit dem CD16⁺-APC-Antikörper fallen die neutrophilen Granulozyten in den linken oberen Quadranten (Q1), der für ein intensives Signal im APC-Kanal spricht (**Abbildung 24**).

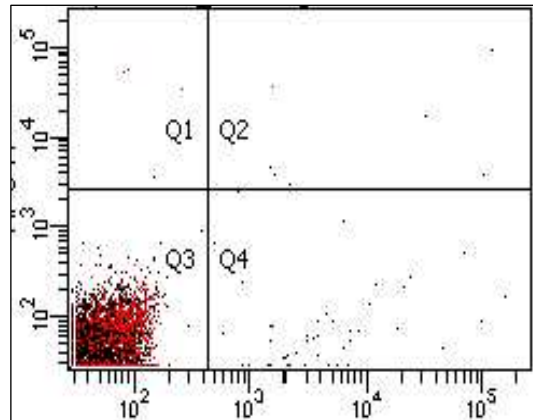


Abbildung 23: Ungefärbtes Vollblut bzw. Pilze im unteren linken Quadranten (Q3) (Abszisse: Fluoreszenzkanal BCECF; Ordinate: Fluoreszenzkanal APC)

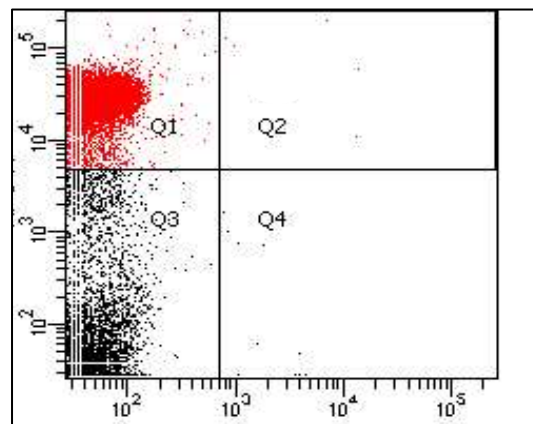


Abbildung 24: Nach erfolgter Markierung befinden sich die CD16⁺-Granulozyten im oberen linken Quadranten (Q1)

Abbildung 25 zeigt die Verschiebung der Pilzzellen (Mel-3) vom unteren linken (**Abbildung 23**) in den unteren rechten Quadranten (Q4), sobald diese den Farbstoff BCECF intrazellulär aufgenommen und sich somit ausreichend angefärbt haben.

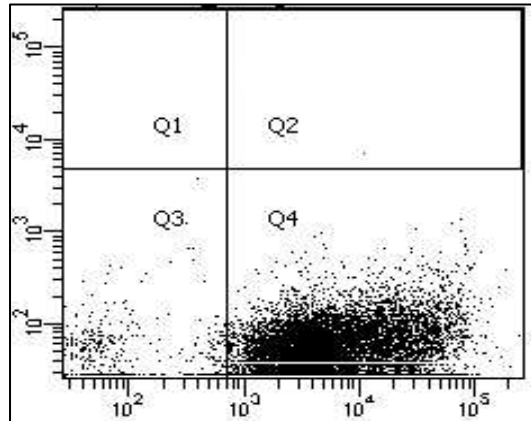


Abbildung 25: BCECF-gefärbte *E. dermatitidis*-Zellen (Mel-3) im unteren rechten Quadranten (Q4)

Nach erfolgter Phagozytose (Zeitpunkt 60 min) müssen also die CD16⁺-markierten Granulozyten, die im oberen linken Quadranten (Q1) zu detektieren sind, eine zusätzliche Fluoreszenz im grünen Bereich (FITC-Kanal) durch inkorporierte, BCECF-gefärbte Pilze (Q4) zeigen. Damit würden sie bezüglich beider Fluoreszenzen „doppelt positiv“ werden und im oberen rechten Quadranten (Q2) erscheinen. Diese Hypothese bestätigte sich, was **Abbildung 26** widerspiegelt.

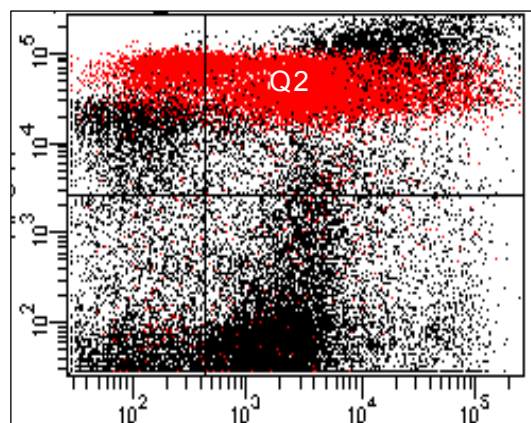


Abbildung 26: Nach erfolgter Phagozytose erscheinen die „doppelt positiven“ Granulozyten im oberen rechten Quadranten (Q2)

Je höher die Phagozytoseleistung der Granulozyten war, umso mehr verschoben sich die beiden getrennten Populationen gemeinsam in den oberen rechten Quadranten.

Dementsprechend konnten die arithmetischen Mittelwerte des prozentualen Anteils der sich im oberen rechten Quadranten (Q2) befindlichen Zellen als Maß für die Phagozytose herangezogen werden. Den Auswertungen von Kontrollansätzen und sämtlichen Zusätzen in Form von Rohextrakt, Fraktionen und Banden des Wildtyps und Mel-3 von *Exophiala dermatitidis* liegt der prozentuale Anteil der Zellen, die sich zu dem jeweiligen Zeitpunkt in Q2 befinden, zugrunde. Mit der Software des Durchflusszytometers ließ sich genau berechnen, zu welchem Prozentsatz die jeweiligen Zellen nach bestimmten Inkubationszeiten in den einzelnen Quadranten zu detektieren waren.

Als Negativkontrolle diente der Kontrollansatz mit zugegebenem PFA (Paraformaldehyd, vierprozentig), das Proteine reversibel vernetzt. So ist eine Adhäsion bzw. Phagozytose der Pilze durch die Granulozyten nicht möglich, da benötigte Rezeptoren nicht zur Verfügung stehen. **Abbildung 27** gibt den Einfluss des PFA wieder. Im relevanten oberen rechten Quadranten (Q2) sind im Falle der Negativkontrolle keine Zellen nachweisbar.

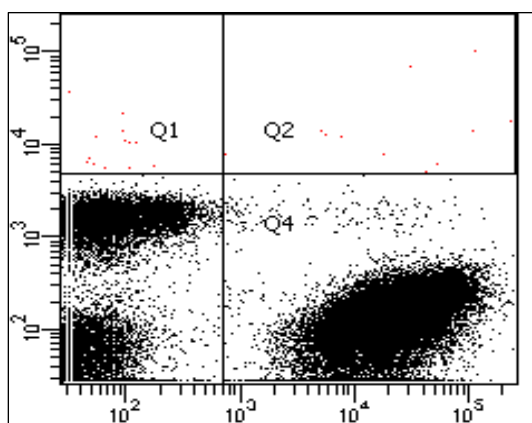


Abbildung 27: Negativkontrolle mit PFA

Granulozyten befinden sich in Q3, da die Bindung des CD16-Antikörpers aufgrund der Quervernetzung der Oberflächenrezeptoren unterbleibt; die gefärbten Pilze liegen in Q4; eine Adhäsion/Phagozytose ist nicht möglich

Die Einteilung der Quadranten in den oben aufgeführten Abbildungen wurde für alle Messungen übernommen. Ziel war eine reproduzierbare Aussage über die Zellen, die zu unterschiedlichen Zeitstufen und mit unterschiedlichen Zusätzen in den Quadranten Q2 fielen.

4.2.3 Einfluss der DMSO-gelösten Rohextrakte von *Exophiala dermatitidis* Wildtyp und Mel-3

Als Grundlage für die Rohextrakte von *E. dermatitidis* Wildtyp und der Mutante Mel-3 dienten je 190 1b-Agarplatten, die, wie in **Kapitel 3.2.3** erläutert, aufgearbeitet wurden. Ein Drittel der Ausbeute wurde entsprechend dem Protokoll von Heidrich (2010) in 5 ml DMSO gelöst, die verbleibenden 10 ml wurden in Methanol aufgefangen und zur Fraktionengewinnung der Säulenchromatographie zugeführt. In mehreren Untersuchungen stellte Heidrich (2010) fest, dass das Lösungsmittel DMSO keinen signifikanten Einfluss auf den Oxidative Burst besitzt. Zur Sicherheit wurde pro Messung der Phagozytoseversuche, die mit dem in DMSO gelösten Rohextrakt durchgeführt wurden, eine Kontrolle mit der alleinigen Zugabe von DMSO (Zeitpunkt 60 Minuten) mitgeführt.

Heidrich gab in ihren Versuchen 50 µl zu einem 1 ml-Vollblutansatz (Heidrich, 2010). In dieser Studie wurde nach genauer Titration der einzelnen Komponenten mit 100 µl-Vollblutansätzen gearbeitet. Dementsprechend wurde den hier betrachteten Proben je 5 µl DMSO bzw. Rohextrakt-DMSO-Gemisch zugegeben. Als Kontrolle diente stets ein Ansatz, in dem nur Hefezellen der Mutante Mel-3 mit Vollblut inkubiert wurden (Vollblut+Mel-3). Im Falle der Negativkontrolle wurde vorab noch PFA zugegeben.

Abbildung 28 zeigt den Anteil der Zellen in Q2 in Prozent im Verlauf der 60-minütigen Inkubationszeit.

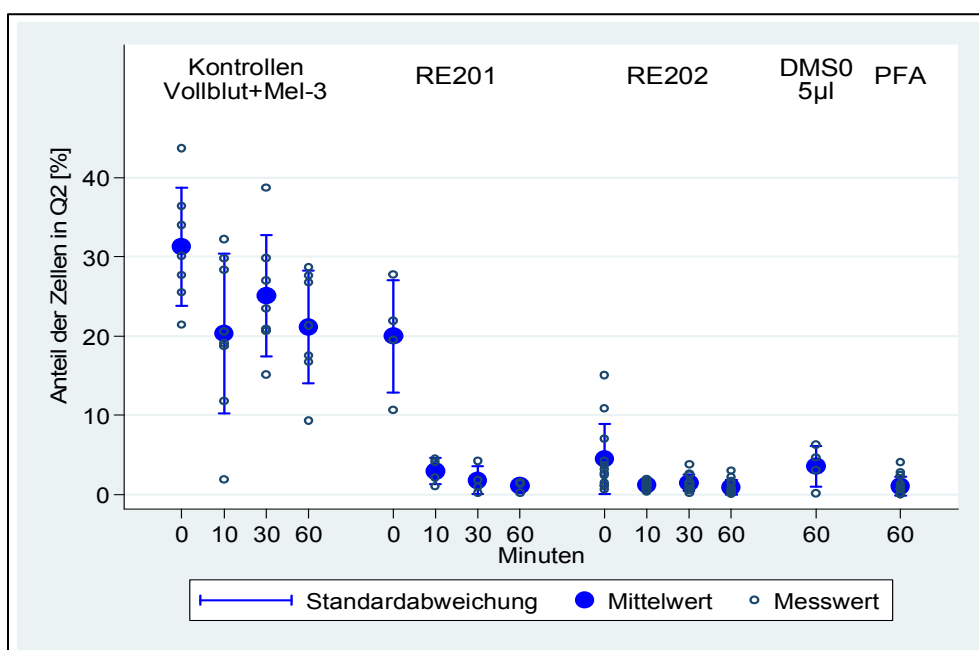


Abbildung 28: Einfluss des DMSO-Rohextraktes vom *E.dermatitidis* Wildtyp (RE202) und der Mutante Mel-3 (RE201) auf die Phagozytose (Anteil der Zellen in Q2 [%]); als Kontrolle dienten immer ein Ansatz ohne Rohextrakt, sowie eine DMSO- und Negativkontrolle (PFA) zum Zeitpunkt „60 Minuten“

Es ist ein signifikanter Rückgang der Zellen, die anteilig in Q2 liegen, unter der Einwirkung von Rohextrakt Mel-3 (RE201) und Wildtyp (RE202) im Vergleich zu den Kontrollen zu verzeichnen. Bei der alleinigen Zugabe von DMSO zu den Ansätzen können nach 60-minütiger Inkubation sehr ähnliche Werte beobachtet werden. Sie alle ähneln stark der Negativkontrolle mit PFA-Zugabe und unterscheiden sich deutlich vom Kontrollansatz. Auch innerhalb der Kontrolle ist eine zeitlich abhängige Schwankung zu erkennen. Nach 10 und 60 Minuten ist der Anteil der Zellen in Q2 im Vergleich zum Ausgangsniveau signifikant zurückgegangen ($p=0,003$ und $p=0,007$). Nach 60 Minuten ist im Vergleich zu 10 Minuten keine weitere Veränderung erkennbar ($p=0,866$). Dieses Bild war in allen Kontrollmessungen dieser Studie reproduzierbar.

Tabelle 7a gibt die gültigen Messungen (n), sowie den jeweiligen Mittelwert (Mw) und die Standardabweichung (SD) dieser Messreihe an.

Tabelle 7a: Gültige Messungen (n), Mittelwert (Mw) und Standardabweichung (SD) der Kontrollen und mit jeweiligem Zusatz von Rohextrakt Mel-3 (RE201) bzw. Wildtyp (RE202)

		n	Mw	SD
Kontrollen	0min	7	31.2	7.5
	10min	7	20.3	10.1
	30min	7	25.1	7.7
	60min	7	21.1	7.1
RE 201	0min	4	19.9	7.1
	10min	4	2.9	1.7
	30min	4	1.8	1.8
	60min	4	1.1	0.6
RE 202	0min	12	4.4	4.4
	10min	12	1.2	0.5
	30min	12	1.4	1.0
	60min	12	0.9	1.0

Die p-Werte sind **Tabelle 7b** zu entnehmen. Hier wurde auch untereinander verglichen. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

Tabelle 7b: p-Werte der Ansätze mit zugegebenem Rohextrakt Mel-3 (RE201) und Wildtyp (RE202) im Vergleich mit der Kontrolle und zueinander

	p-Werte			
	0 min	10 min	30 min	60 min
RE201 iVz. Kontrolle	0.001	0.000	0.000	0.000
RE202 iVz. Kontrolle	0.000	0.000	0.000	0.000
RE201 iVz. RE202	0.000	0.572	0.880	0.912

Beide Rohextrakte unterscheiden sich zu allen Zeitstufen (0-10-30-60 Minuten) signifikant von der Kontrolle ($p \leq 0,05$). Vergleicht man die Rohextrakte untereinander, ist der Unterschied

nur zum Zeitpunkt 0 Minuten signifikant. Betrachtet man die Kontrollen und die Ansätze mit DMSO zum Zeitpunkt 60 Minuten, kann ein signifikanter Rückgang festgestellt werden (**Tabelle 8**).

Tabelle 8: Vergleich der Kontrollen mit dem DMSO-Ansatz nach 60 Minuten

	gültige n	Mw	SD
Kontrollen 60min	7	21.1	7,1
DMSO 5 µl, 60min	4	3.5	2.6

p=0.000

Tabelle 9 beinhaltet die Gegenüberstellung der beiden Kontrollansätze. Die hohe Versuchszahl bei den Kontrollen (n=61) resultiert aus allen Kontrollansätzen zum Zeitpunkt 60 Minuten, die schlussendlich in die Auswertung dieser Studie miteinbezogen wurden. Ziel ist eine Kompensation der Schwankungsbreite. Es ist ein signifikanter Unterschied zwischen den Kontrollansätzen zu sehen.

Tabelle 9: Vergleich der beiden Kontrollansätze zum Zeitpunkt 60 Minuten

	gültige n	Mw	SD
Kontrollen (60 min)	61	21.1	9.2
PFA (60 min)	17	1.0	1.2

p = 0.000

Es konnte gezeigt werden, dass das DMSO in alleiniger Zugabe zu einer signifikanten Abnahme des prozentualen Anteils der Zellen in Q2 führte. Da sich die beiden in DMSO gelösten Rohextrakte genauso darstellten, ist deren Einfluss nicht auswertbar. Es folgten mehrere Titrationsmessreihen. Sowohl die zugegebene Menge als auch einzelne Verdünnungsstufen von DMSO wurden variiert. Es konnte jedoch keine zufriedenstellende Dosierung ermittelt werden, mit der den Kontrollwerten vergleichbare Messwerte zu erzielen waren.

4.2.4 Methanol als Lösungsmittel der Pigmente

Der in DMSO gelöste Wildtyp- und Mel-3-Rohextrakt von *E.dermatitidis* konnte nicht weiter verwendet werden. Da die Fraktionierung der Rohextrakte zum Zeitpunkt der Messungen schon abgeschlossen war, stand ein Pigmentrohgemisch ohne DMSO-Zusatz nicht mehr zur Verfügung. Daher musste direkt mit den Fraktionen weitergetestet werden. Es stellte sich nun die Frage, inwieweit der Lösungsvermittler der Pigmente, das Methanol, einen Einfluss auf die Phagozytoseaktivität der Zellen besitzt. Hierfür wurde eine Titrationsmessreihe (5, 4 und 3µl) durchgeführt, um einen Einfluss reproduzierbar auszuschließen. Verglichen wurde Methanol zusätzlich mit Ethanol als einem weiteren möglichen Lösungsmittel für die Pigmente.

Tabelle 10 gibt die ermittelten Werte von Kontrollen, mit Zusatz von Methanol und Ethanol aus einer direkten Vergleichsmessreihe wieder. Inkubiert wurden diese Proben für 60 Minuten. Die p-Werte sind der unteren Tabelle zu entnehmen (**Tabelle 10**).

Tabelle 10: Gegenüberstellung von Methanol und Ethanol mit Bezug auf die Kontrollen;
untere Tabelle: daraus resultierende p-Werte

		gültige n	Mw	SD
Kontrollen		61	21.9	9.2
Methanol	5µl	2	18.9	1.8
	4µl	2	25.4	0.5
	3µl	2	19.9	3.0
Ethanol	5µl	2	4.7	2.0
	4µl	2	18.0	7.7
	3µl	2	10.0	1.3
Zusammenfassung				
	Methanol	6	21.4	3.5
	Ethanol	6	10.9	7.0

	p-Werte			
	alle Proben	5µl	4µl	3µl
Methanol iVz. Kontrolle	0.725	0.464	0.703	0.576
Ethanol iVz. Kontrolle	0.014	0.002	0.390	0.025
Methanol iVz. Ethanol	0.001	0.011	0.192	0.076

Es zeigt sich, dass sich der Ansatz mit Zugabe Methanol im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikant unterscheidet. Dies gilt sowohl, wenn man alle sechs Methanolergebnisse mit den Kontrollen vergleicht, als auch wenn man die drei Dosierungen separat betrachtet. Allerdings unterscheidet sich Ethanol signifikant von der Kontrolle ($p=0.014$), wenn man alle Dosierungen gemeinsam beurteilt. Bei Zusammenfassung der drei Dosierungen sind signifikante Unterschiede zwischen Methanol und Ethanol ($p=0.001$) zu sehen.

In **Abbildung 29** sind die Werte in graphischer Darstellung zu sehen. Als Orientierungswert dient nochmals der 5 µl DMSO-Zusatz bei 60 Minuten.

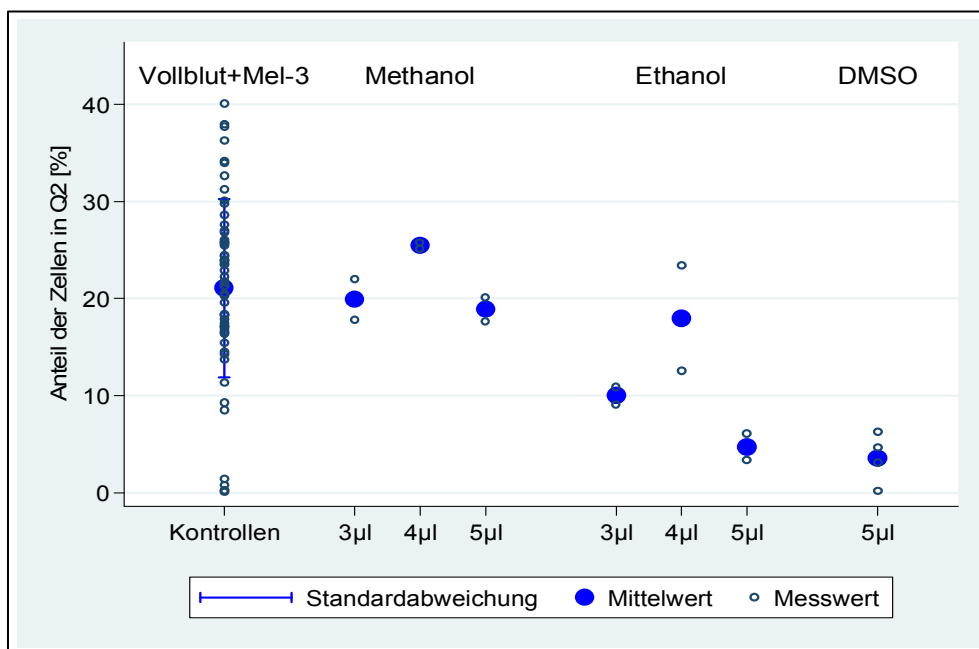


Abbildung 29: Graphische Darstellung der Titrationen von Ethanol und Methanol und ihr Vergleich mit den Kontrollen (Zeitpunkt 60 Minuten); zur Veranschaulichung der DMSO-Ansatz nach 60 Minuten

Zum Ausschluss von etwaigen Unterschieden zur Kontrolle wurde die 3 µl-Dosierung des Methanols ausgewählt. Für alle anschließenden Messungen wurden die Pigmente in Methanol gelöst und in 3 µl-Aliquots den Ansätzen zugegeben. Zusätzlich wurde fortan pro Messreihe auch ein Ansatz zur Methanolkontrolle mitgeführt.

4.2.5 Einfluss der (Sephadex-) Fraktionen

Im Anschluss an die Titrations konnte nun der Einfluss der in Methanol gelösten Fraktionen untersucht werden. Zunächst sollte ein Pool der jeweiligen Säulenchromatographie-Fractionen Aufschluss über einen möglichen Effekt auf die Phagozytose geben. Dabei wurden für den Wildtyp die Fraktionen 1-7 (F1-F7) gepoolt, um zunächst einmal deren Gesamtwirkung zu beurteilen. Die Fraktionen der melanindefizienten Mutante wurden aufgrund der großen Anzahl in zwei Pools unterteilt: Fraktionen 1-3 (F1-F3) und Fraktionen 4-10 (F4-10). In den einzelnen Untersuchungen wurden jeweils 3 µl dieser gepoolten Pigmentfraktionen hinzugegeben.

4.2.5.1 *Exophiala dermatitidis* Wildtyp (ATCC No.34100)

Untersucht wurde der Pool aus den sieben Fraktionen des Wildtyps gezielt nach 0 und 60 Minuten (**Abbildung 30**), um einen Einfluss auf die Phagozytose festzustellen.

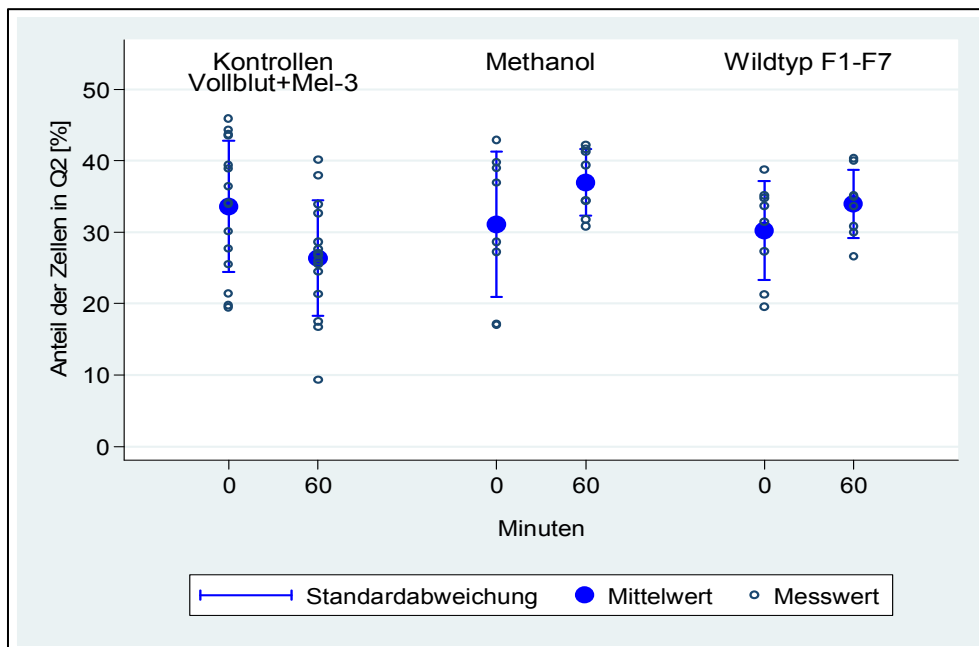


Abbildung 30: Einfluss der gepoolten Pigment-Fraktionen F1-F7 von *E. dermatitidis* Wildtyp auf die Phagozytose (n=8)

Vergleicht man die Kontrollen mit den Methanolansätzen zeigt sich im Zeitverlauf keine

signifikante Veränderung. Das gleiche gilt für die Fraktionen F1-F7 des Wildtyps. Das Niveau liegt bei Methanol und Wildtyp F1-F7 nach 60 Minuten signifikant über dem der Kontrollen. Da die Gesamtheit der Fraktionen des Wildtyps schon keinen tendenziellen Einfluss auf die Phagozytose zeigte, wurde auf die Untersuchung der einzelnen Wildtyp-Fraktionen verzichtet.

4.2.5.2 *Exophiala dermatitidis* Mel-3 (ATCC No. 44504)

Abbildung 31 zeigt die Einwirkung der gepoolten Fraktionen Mel-3 F1-F3 und F4-F10 im zeitlichen Verlauf von 0 bis 60 Minuten.

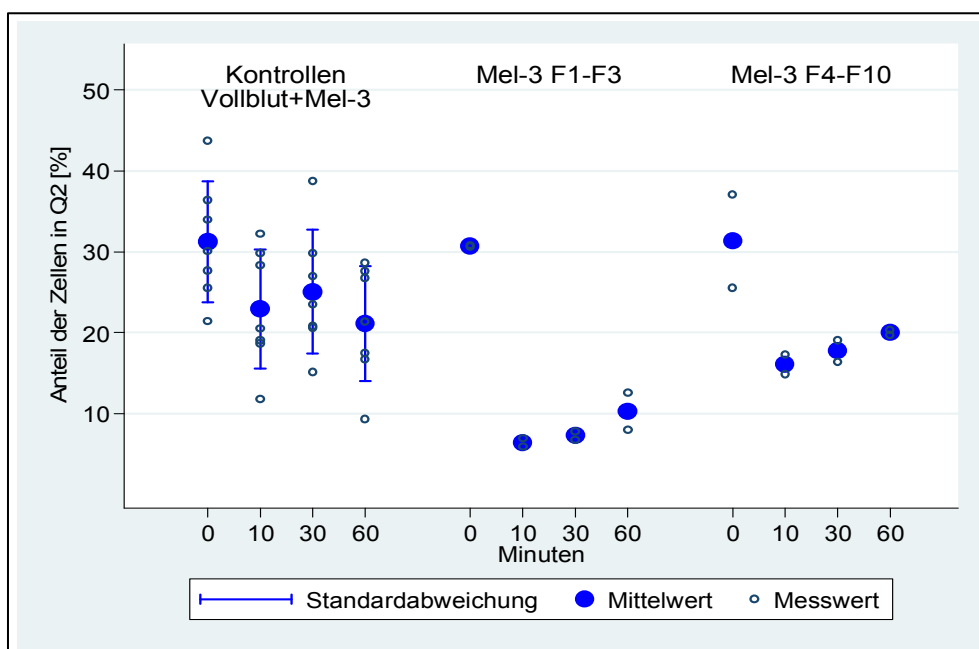


Abbildung 31: Phagozytose-Kontrollansatz mit Mel-3 (n=7) im Vergleich zu den Ansätzen mit Zugabe der Pigment-Fraktionen Mel-3 F1-F3 und F4-F10 im zeitlichen Verlauf (n=2)

Sowohl bei den Kontrollen als auch bei Mel-3 F1-F3 und Mel-3 F4-F10 unterscheidet sich Zeitpunkt 0 signifikant von den übrigen Zeitpunkten. Zwischen 10, 30 und 60 Minuten besteht nicht immer ein signifikanter Unterschied (**Tabelle 11**).

Tabelle 11: Vergleich von Mel-3 F1-F3 und F4-F10 mit der Kontrolle und miteinander anhand der p-Werte

	p-Werte			
	0 Minuten	10 Minuten	30 Minuten	60 Minuten
Mel-3 F1-F3 iVz. Kontrolle	0.324	0.000	0.000	0.005
Mel-3 F4-F10 iVz. Kontrolle	0.378	0.000	0.000	0.431
Mel-3 F1-F3 iVz. F4-F10	0.917	0.000	0.000	0.000

Zu Beginn der Zeitstufen (0 Minuten) unterscheiden sich die Ansätze nicht signifikant (**Tabelle 11**). Die Fraktionen Mel-3 F1-F3 zeigen zu allen weiteren Zeitpunkten immer signifikante Abweichungen von den Kontrollen. Die gepoolten Fraktionen Mel-3 F4-F10 unterscheiden sich nur nach 10 und 30 Minuten signifikant von der Kontrolle. Signifikante Unterschiede zwischen den Fraktionen Mel-3 F1-F3 und Mel-3 F4-F10 bestehen bei 10, 30 und 60 Minuten. Aus diesem Grund waren nun die Fraktionen Mel-3 F1-F3 von Interesse. In weiteren Messungen wurde deren Einzelwirkung auf den Verlauf der Phagozytose untersucht.

Bei den Fraktionen Mel-3 F1 und F2 zeigen sich signifikante Unterschiede zwischen 0 und 60 Minuten in Form eines Rückgangs (**Abbildung 32**). Bei Fraktion Mel-3 F2 ist der Anteil der phagozytierten Pilzzellen zu beiden Zeitpunkten signifikant niedriger als bei den Kontrollen. Bei Fraktion Mel-3 F3 zeigt sich nach 60 Minuten ebenfalls ein signifikanter Unterschied zur Kontrolle: Das Niveau ist über das der Kontrollen angestiegen. Der Anteil der phagozytierten Zellen bei alleiniger Zugabe von Methanol liegt tendenziell leicht über dem der Kontrollen, es gibt jedoch keine signifikanten Unterschiede.

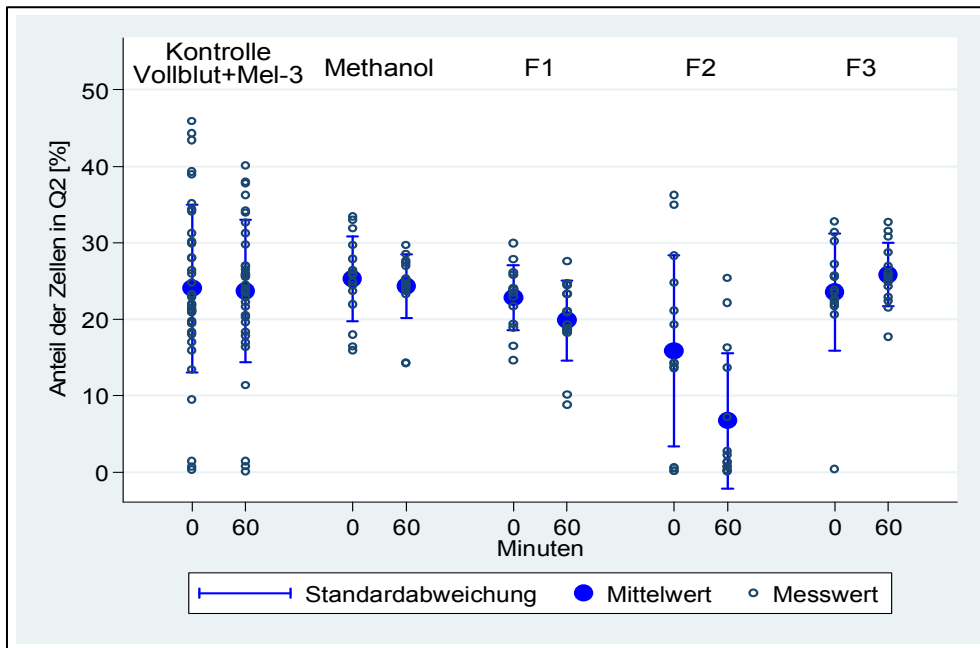


Abbildung 32: Ablauf der Phagozytose der Mutante Mel-3 ohne (Kontrollen; n=34) und mit der Zugabe von Methanol (n=16) und den Fraktionen Mel-3 F1, F2 oder F3 (n=14)

Tabelle 12 gibt Auskunft über die Veränderungen im zeitlichen Verlauf. Diese sind bei F1 und F2 signifikant.

Tabelle 12: Signifikanzen im zeitlichen Verlauf von 60 Minuten

	p-Werte				
Vergleich	Kontrollen	Methanol	F1	F2	F3
60 min iVz. 0 min	0.621	0.288	0.040	0.026	0.331

Die Fraktion 2 der Mutante Mel-3 wurde nun nochmals genauer in Bezug auf verschiedene Zeitpunkte untersucht (**Abbildung 33**). Wird Methanol zum Ansatz mit Mel-3 zugegeben, zeigt sich im Zeitverlauf keine signifikant Veränderung. Nach Zugabe von Fraktion Mel-3 F2 ist ein kontinuierlicher Abfall der prozentualen Anteile nach 10 und 60 Minuten erkennbar. Sie unterscheidet sich zu allen Zeitpunkten signifikant von den Kontrollen (p=0.000).

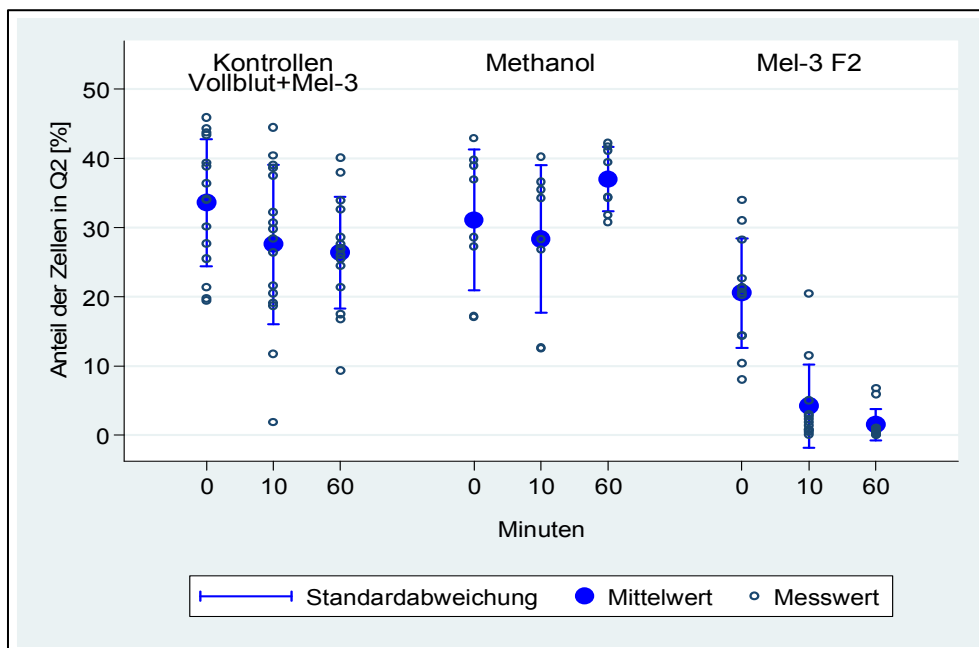


Abbildung 33: Einfluss der Fraktion 2 der Mutante Mel-3 auf die Phagozytose im zeitlichen Verlauf (n=12)

Der oben beschriebene massive Rückgang der Zellen, die zu den jeweiligen Zeitstufen in Q2 lagen, gab den Anlass, die Veränderungen der Zellen in der Dotplotdarstellung des Durchflusszytometers - sowohl in der Auftragung von SSC gegen FSC, wie auch der beiden Fluoreszenzen APC und FITC - genauer zu betrachten. Dabei fiel auf, dass die markierten Granulozyten in einigen Messungen teilweise nicht mehr zu detektieren waren (**Abbildung 34**).

Bereits nach 0 Minuten sieht man einen deutlichen Zellrückgang in Q2 unter dem Einfluss der Fraktionen F1 (**B**) und F2 (**C**) im Vergleich mit dem Kontrollansatz (**A**). Fraktion 3 (**D**) stellt sich weitestgehend so dar wie die Kontrolle. Nach maximaler Inkubationszeit von 60 Minuten scheint sich das Zellzahlniveau unter dem Einfluss von Fraktion 1 (**B**) wieder dem der Kontrolle (**A**) anzugleichen, die Granulozyten sind detektierbar (rote Punktwolke im Dotplot FSC gegen SSC). Fraktion 3 (**D**) gleicht nach wie vor weitestgehend dem Kontrollansatz. Anders verhält sich der Ansatz mit zugegebener F2 (**C**) nach 60-minütiger Inkubation. Hier sind außer den angefärbten Pilzzellen von Mel-3 keine weiteren Zellen feststellbar.

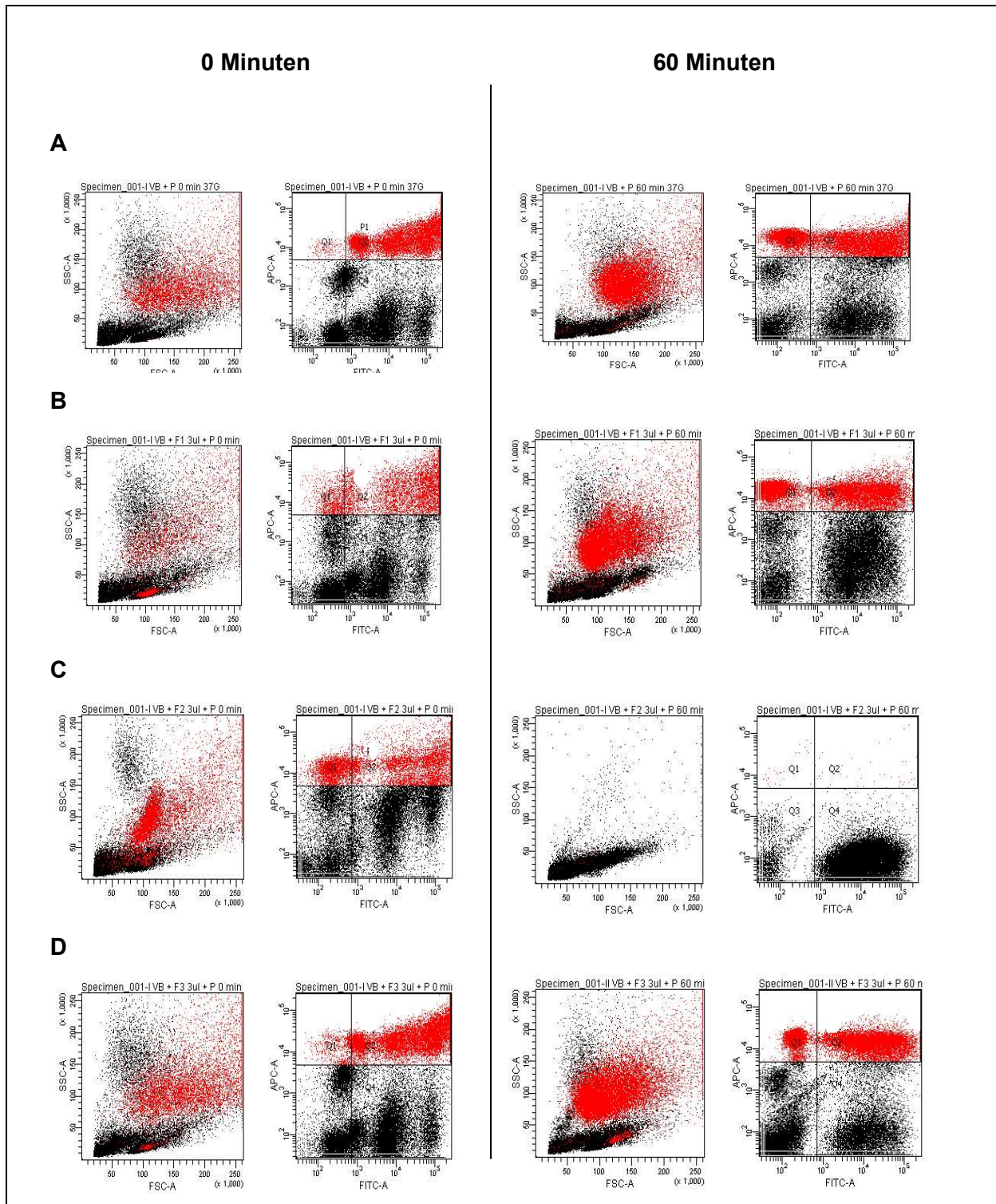


Abbildung 34: Darstellung des zeitlichen Verlaufs und Einflusses der Fraktionen Mel-3 F1-F3 (**B-D**) im Vergleich zur Kontrolle (**A**); linksbündig jeweils die korrespondierenden Dotplotdarstellungen zum Zeitpunkt 0 Minuten, rechtsbündig nach 60-minütiger Inkubation

Wie in **Abbildung 35** zu sehen, ist diese Auswirkung bereits nach 10-minütiger Inkubation sichtbar (**B**). Unter **C** wird zum Vergleich die Negativkontrolle mit PFA angeführt. Hierbei sind die Granulozyten nach Erythrozytenlyse deutlich in Q3 sichtbar, die Bindung des fluorochrommarkierten Antikörpers kann jedoch nicht stattfinden.

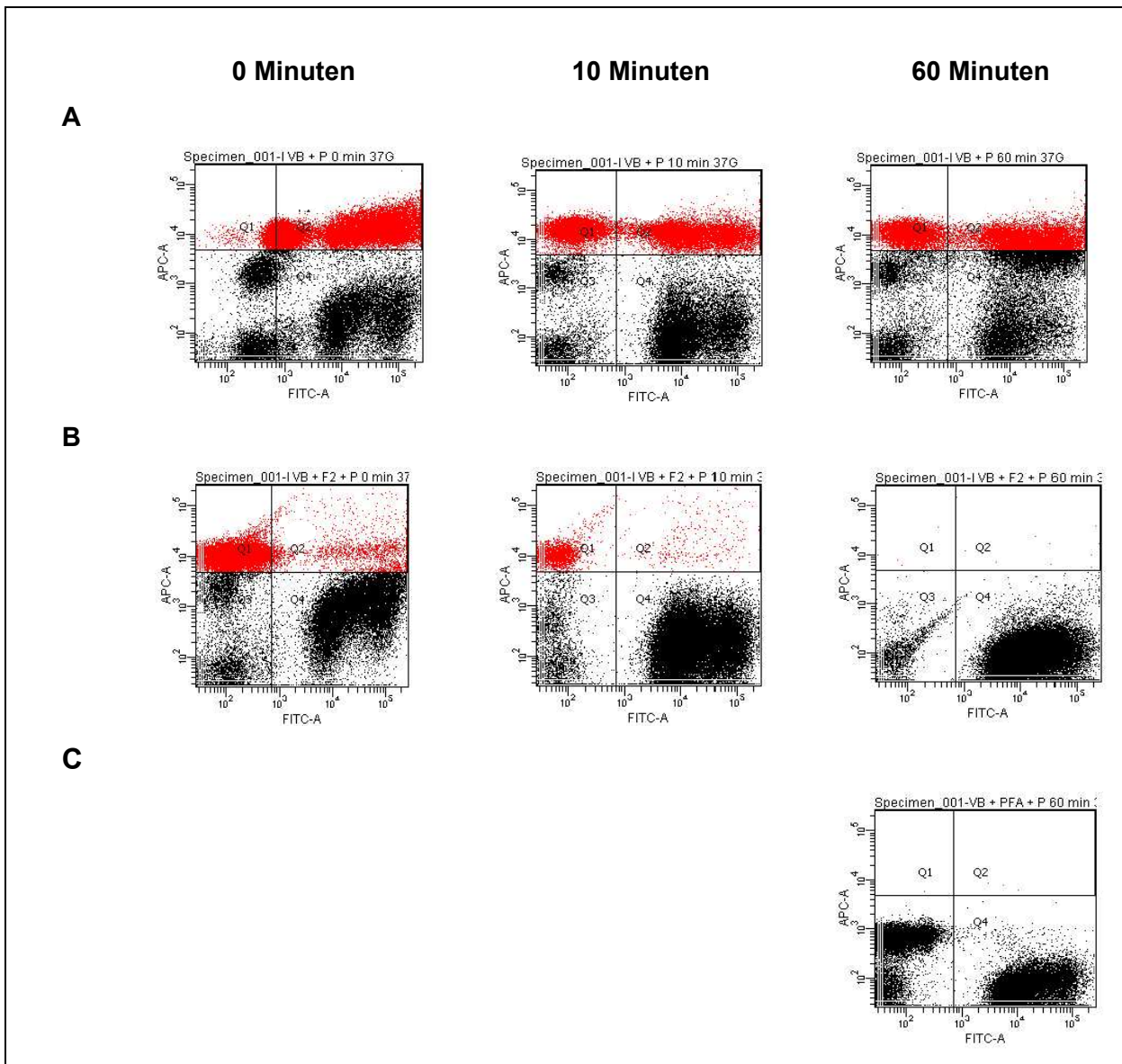


Abbildung 35: Darstellung der Phagozytose nach 0,10 und 60 Minuten
A: Kontrollansatz; **B:** Zusatz F2 Mel-3; **C:** Negativkontrolle mit PFA

Weitere Untersuchungen zu konzentrationsabhängigen Effekten wurden nicht gemacht. Stattdessen wurde die Fraktion F2 dünnschichtchromatographisch aufgearbeitet.

4.2.6 Einfluss der dünnschichtchromatographischen Banden

Die Fraktion 2 (Mel-3) wurde in fünf Banden eingeteilt (**Abbildung 36**). Nach dem Auskratzen der Banden wurde ein Teil davon für die Messungen am Durchflusszytometer abgegriffen, der restliche Teil der weiteren Aufreinigung der HPLC zugeführt.

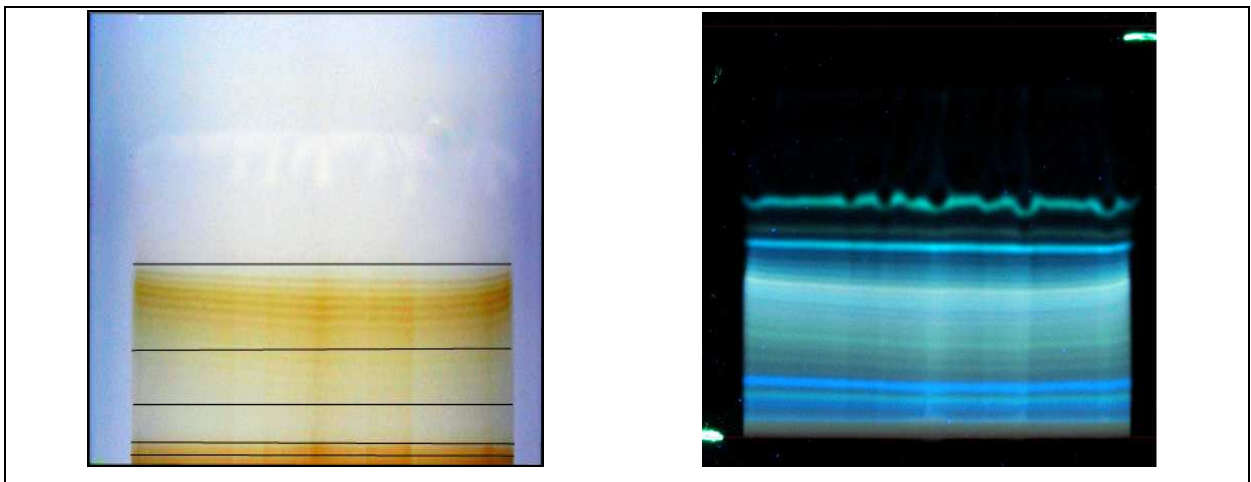


Abbildung 36: Unterteilung der Sephadex-Fraktion F2 der Mutante Mel-3 in fünf einzelne Banden (links bei Tageslicht, rechts bei 366 nm)

Diese Vorgehensweise diente der Aufklärung der Frage, ob alle Banden der Fraktion 2 einen Zellzahl-vermindernden Effekt entfalten oder einzelne eventuell auch eine Phagozytose-Hemmung auslösen. In **Abbildung 37** ist die Darstellung des Einflusses der fünf verschiedenen DC-Banden graphisch aufgeführt.

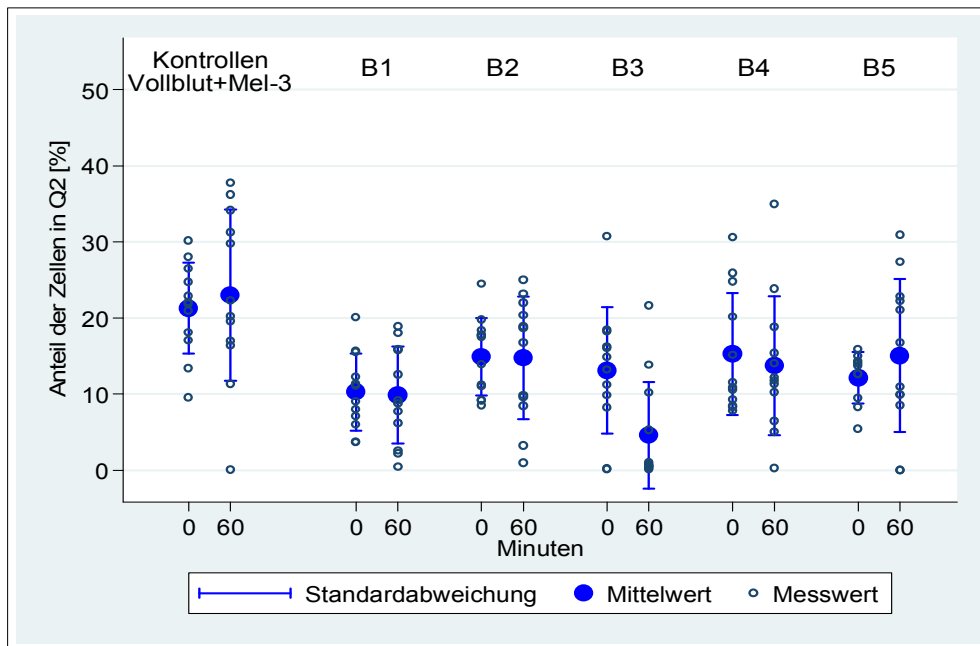


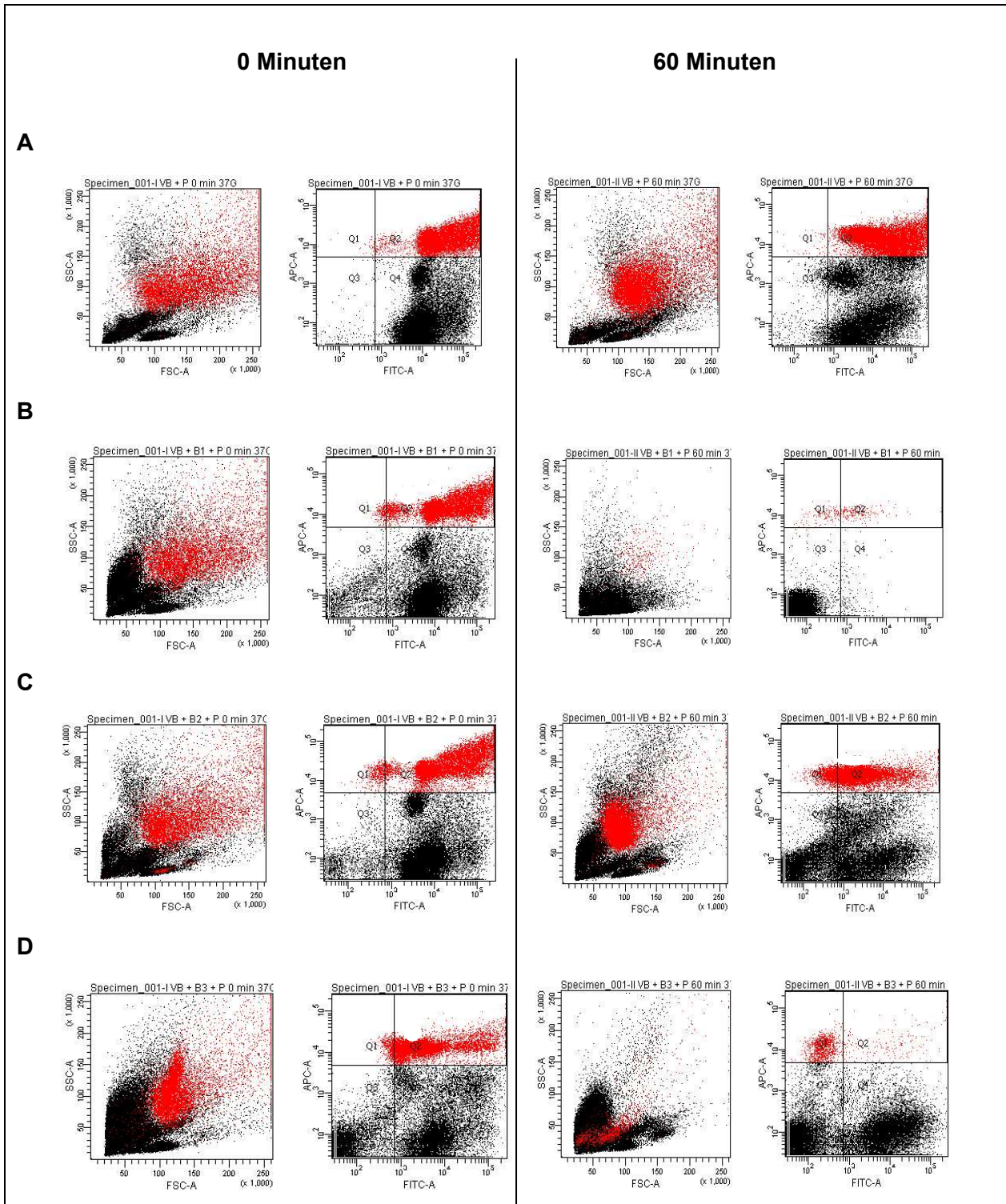
Abbildung 37: Vergleich des Einflusses der fünf verschiedenen DC-Banden (B1-B5) der Sephadex-Fraktion F2 (Mel-3) auf die Phagozytose (n=12)

Tabelle 13 demonstriert, dass die einzelnen Banden zu beiden Zeitpunkten (0 und 60 Minuten) eine signifikante Hemmung der Phagozytose induzieren.

Tabelle 13: Veränderungen durch Zugabe der Banden B1-B5 im zeitlichen Verlauf im Vergleich zum Kontrollansatz

	p-Werte	
	0 Minuten	60 Minuten
B1 iVz. Kontrolle	0.000	0.000
B2 iVz. Kontrolle	0.001	0.013
B3 iVz. Kontrolle	0.000	0.000
B4 iVz. Kontrolle	0.002	0.005
B5 iVz. Kontrolle	0.000	0.017

Betrachtet man vergleichend die Dotplotdarstellungen (**Abbildung 38**), kann man erkennen, dass nicht alle Banden die in **Kapitel 4.2.5.2 (Abbildung 34 und 35)** aufgeführten Effekte entfalten.



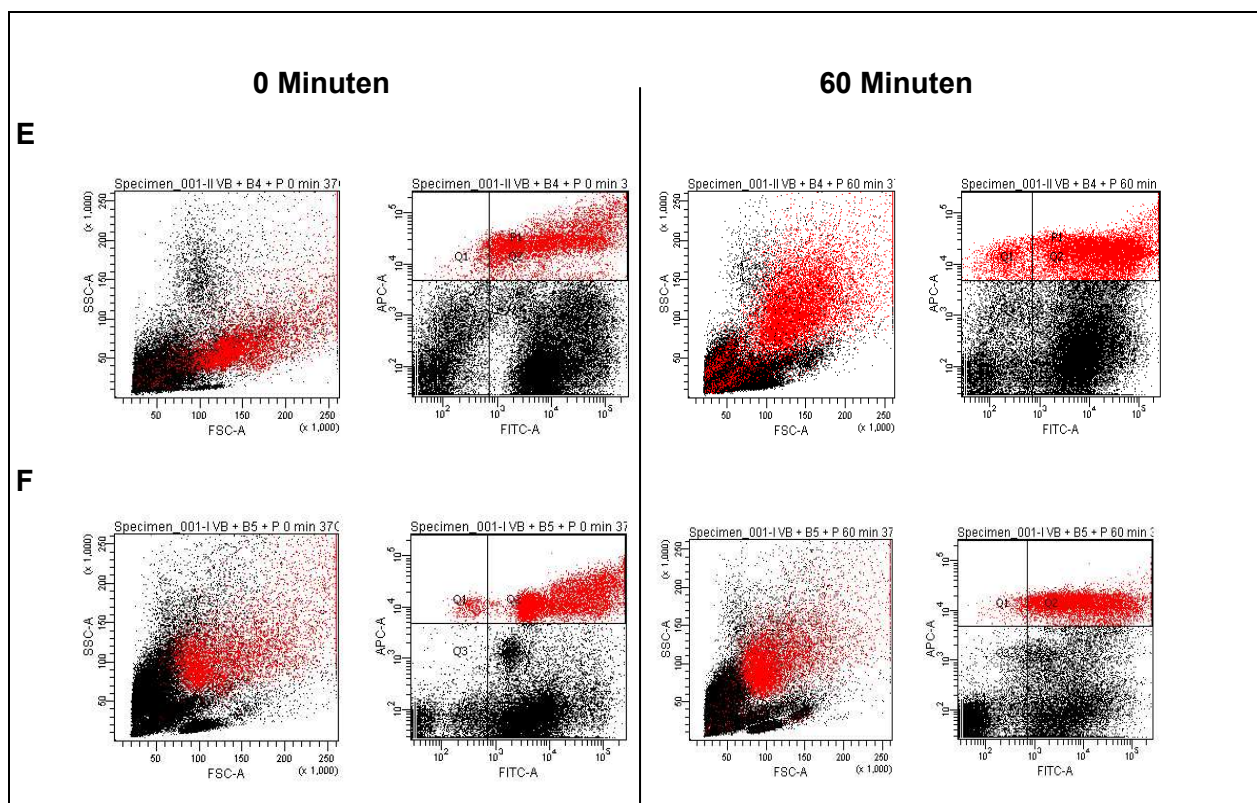


Abbildung 38: Dotplotdarstellungen der Einwirkung der Banden B1-B5 (**B-F**) Mel-3 nach 0 (linksbündig) und 60 Minuten (rechtsbündig) im Vergleich mit der Kontrolle (**A**)

Man sieht deutlich, dass Bande B1 und B3 (Mel-3) (**B, D**) der Fraktion F2 noch ähnliche Tendenzen besitzen wie unter der Zugabe der kompletten F2. Dabei ist auffällig, dass nach 60-minütiger Inkubationszeit mit B1 (**B**) weder Granulozyten noch Pilze zu detektieren sind. Bei den anderen Banden - B2, B4 und B5 - sind neben den Pilzen (Mel-3) in Q4 auch noch die Granulozyten enthalten (**C, E** und **F**). Verdeutlicht wird das durch die jeweilige Dotplotdarstellung FSC (Größe) gegen SSC (Granularität), die den gegateten Granulozyten der Kontrolle bei 0 und 60 Minuten ähnelt. Auffallend ist dabei, dass sich die Lage der Hefezellen in Q3 kaum verändert, d.h. eine Phagozytose weitestgehend unterbleibt.

Trotz der Erhaltung der Zellen ist ein signifikanter Unterschied in allen Zeitstufen auch bei den Banden B2, B4 und B5 zu sehen (**Tabelle 13**). Ein toxischer Einfluss kann durch die durchflusszytometrische Darstellung ausgeschlossen werden, da die Zellen unverändert erscheinen. Die signifikante Hemmung der Phagozytose ist auf den Einfluss der Banden B2 (R_F -Wert: 0,12), B4 (R_F -Wert: 0,75) und B5 (R_F -Wert: 1) zurückzuführen. Die Banden wurden

via HPLC weiter aufgereinigt. Die Zugabe zu den Ansätzen in zwei Versuchen zeigte keine Auswirkung auf die Phagozytose. Der limitierende Faktor hierfür waren sehr wahrscheinlich die verschwindend geringen Mengen der Substanzen bereits vor deren weiterer Aufarbeitung via HPLC.

4.2.7 Einfluss von Pityriazol

Im Rahmen einer Kooperation der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. P. Mayser mit der TU Dresden sollte der Einfluss des Carbazolalkaloids Pityriazol auf die Phagozytose untersucht werden (**Abbildung 39**). Es handelt sich dabei um einen Metabolit von *Malassezia furfur*, dessen Totalsynthese 2008 publiziert wurde (Forke et al. 2008). Die Substanz lag in pulverisierter Form vor (10,3 mg). Sie wurde in 300 µl Methanol resuspendiert und in 3 µl-Aliquots dem jeweiligen Ansatz zugegeben.

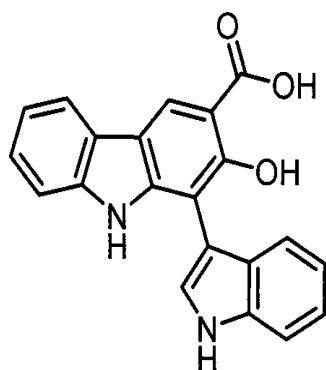


Abbildung 39: Pityriazol aus *Malassezia furfur* (C₁₂H₁₄N₂O₃, MW: 342.3475) (nach Forke et al.)

Weder nach 0 noch nach 60 Minuten konnte ein signifikanter Einfluss des Pityriazols auf die Phagozytose festgestellt werden (**Abbildung 40**).

Die Kontrolle mit Methanol lief zum Ausschluss eines Einflusses durch Methanol (n=16) mit, verglichen wurde mit allen Kontrollen zum Zeitpunkt 0 und 60 Minuten (n=34).

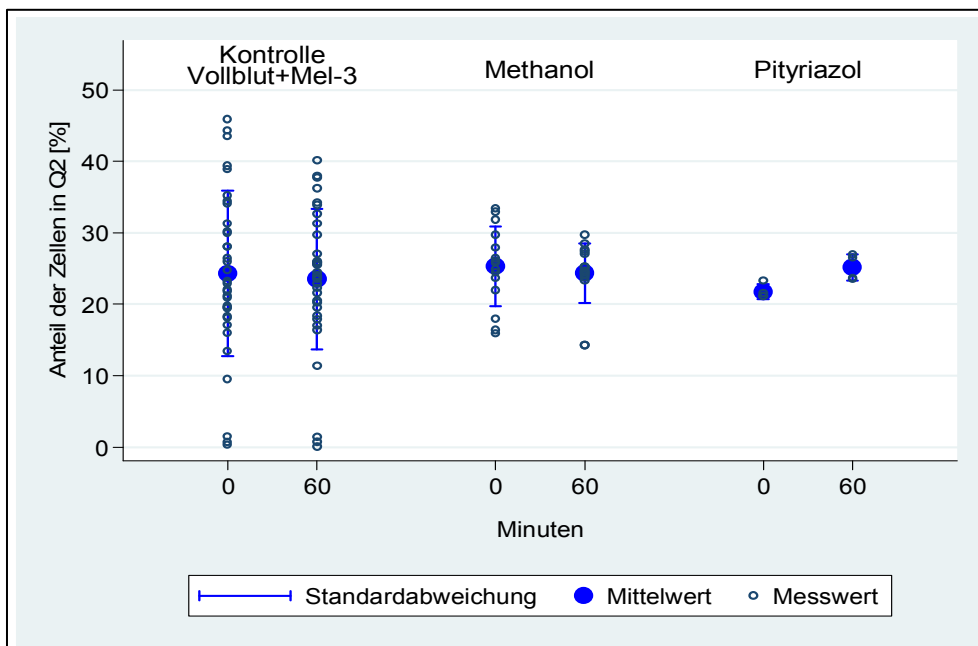


Abbildung 40: Untersuchungen zum Einfluss des Pityriazols aus *Malassezia furfur* auf die Phagozytose von *E.dermatitidis*-Mel-3 durch neutrophile Granulozyten (n=4)

4.2.8 Versuche zur Darstellung des Hemmstoffes „Anthrazit“ von Heidrich 2010

Nach intensiver Plattenproduktion (1000 1b-Platten) und daraus resultierender hoher Ausbeute an Rohextrakt (75 ml) konnte nach säulen- und dünnschichtchromatographischer Aufreinigung die graue Bande aus Fraktion 6 Mel-3 mit dem R_f -Wert von 0,50 zunächst isoliert werden. Die gesamte Menge war jedoch nicht ausreichend, um die Struktur des Oxidative Burst-Hemmstoffes „Anthrazit“ aufzuklären.

Auf eine explizite Prüfung der Fraktion 6 in den Phagozytoseversuchen wurde verzichtet, weil sich Hinweise auf eine Phagozytosebeeinflussung bei den diesbezüglichen Messungen mit dem Fraktionspool F4-F10 nicht ergeben haben.

5 Diskussion

Pilzerkrankungen haben in den letzten Jahren massiv an Bedeutung gewonnen. Dabei stellen sich die Mechanismen einiger pathogener Pilze äußerst komplex dar. Auf genetischer Ebene gelang es, einige Virulenzfaktoren aufzuklären. Dies steht im Zusammenhang mit erweiterten Kenntnissen über die Wirtreaktionen auf den einwirkenden Stimulus, wobei die Pathogenese systemischer Pilzinfektionen als Grundlage dient. Zu unterscheiden sind generell zwei Klassen von Pilzpathogenen: Zum einen handelt es sich um primär pathogene Pilze (z.B. *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*), die ein Umweltreservoir besitzen und Individuen infizieren, die entweder einer großen Anzahl dieser Pilze ausgesetzt waren oder nur immunologisch naiv auf diese reagieren können. Zum anderen spielen opportunistische Keime, die zum Teil ein Reservoir in der Umwelt aufweisen (*Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus*) oder Kommensalen sind (*Candida spec.*) bei Immunsupprimierten zunehmend eine Rolle (van Burik and Magee 2001). Dies resultiert nicht zuletzt aus dem weit verbreiteten therapeutischen Einsatz von Immunsuppressiva (z.B. Glukokortikoiden), aber auch aus der zunehmenden Zahl von Patienten mit HIV-Infektionen, Krebserkrankungen, Knochenmarks- und Organtransplantationen, sowie dem Einsatz von Chemotherapeutika. Außerdem treten vermehrt Resistenzen einiger Spezies gegenüber konventionellen Antimykotika auf. So sind die Mechanismen in der Pathogenese von Pilzerkrankungen viel weniger verstanden als die der bakteriellen Infektionen, da nur wenige Pilze im Gegensatz zu Bakterien wahre Pathogene sind. Meist handelt es sich um saprophytische Keime oder Kommensalen, die mit dem Wirt koexistieren, ohne negative Auswirkungen zu haben. Dennoch gibt es auch bei Pilzen bereits bekannte Pathogenitätsfaktoren. Deren Wachstumstemperatur bei 37°C bis hin zu 42°C, die Fähigkeit zur Adhäsion, wie auch zur Penetration und anschließender Dissemination ebenso wie nutritive und metabolische Faktoren der betreffenden Pilze gehören beispielsweise dazu.

Exophiala dermatitidis vereint diese Eigenschaften bzw. Fähigkeiten in sich. Auch die morphologische Diversität dieses dimorphen Keimes, nämlich in Hyphen- und Hefeform wachsen zu können, unterstreicht dessen potentielle Pathogenität. Durch das Wachstum bei unterschiedlichen pH-Werten kann er sich spezifischen Organismen anpassen und vermag darüber hinaus aufgrund der Melanineinlagerungen in der Zellwand, sich vor den Auswirkungen des Oxidative Burst zu schützen (Heidrich 2010).

Zwar sind die melanindefizienten Mutanten dieser Spezies weniger infektiös als der Wildtyp. Sie sind aber dennoch in der Lage, dieselben neurologischen Symptome wie der melanbildende Wildtyp im Mausmodell auszulösen (Dixon et al. 1987; Dixon et al. 1989; Dixon et al. 1992; Calvo et al. 2010).

In Studien von Schnitzler et al. (1999) konnte gezeigt werden, dass sich *Exophiala dermatitidis* Wildtyp mit dem Melanin zwar vor dem Killing in den Phagolysosomen der neutrophilen Granulozyten schützt, jedoch nicht vor der Phagozytose. Die Fähigkeit, die Effekte des Oxidative Burst zu unterdrücken, wurde hinsichtlich der Pathogenese der Phaeohyphomycose als bedeutend angesehen (Peltroche-Llacsahuanga et al. 2003). Durch den Vergleich des Wildtyps mit seiner Mutante Mel-3 gelang die Darstellung der Schutzwirkung des Melanins vor dem Oxidative Burst im Vollblutansatz (Heidrich 2010). Die vorliegende Arbeit sollte an die Ergebnisse von Heidrich anknüpfen und somit über Untersuchungen zum Einfluss von Melanin oder Carotenoiden auf die Phagozytose neutrophiler Granulozyten (Schnitzler et al. 1999) hinausgehen.

In der Arbeitsgruppe um P. Mayser wurde bei *Malassezia furfur* zum ersten Mal das Phänomen der Bildung von Pigmenten und Fluorochromen durch Verstoffwechselung der Aminosäure Tryptophan beschrieben, wenn diese als alleinige Stickstoffquelle vorhanden ist (Mayser et al. 1998). Dank weiterführender Untersuchungen bezüglich der Abhängigkeit der Pigmentbildung von der Art der Stickstoffquelle konnte gezeigt werden, dass die Bildung der Pigmente spezifisch für die Umwandlung des Tryptophans ist (Mayser et al. 2004). Dabei kann die Verwertung von Tryptophan zur Bildung der Pigmente grundsätzlich auf zwei verschiedenen Synthesewegen erfolgen. Zum einen durch Öffnung des Pyrrolringes des Indols und Bildung von Ommochromen, ihren Vorstufen, Pteridinen sowie Phenoxazin via Polyketidsynthasen. Zum anderen durch den Erhalt des Indolringes und die Bildung von Indolderivaten (**Kapitel 1.3.2.2**).

Neben der strukturellen Analyse dieser Substanzen konnten bereits mehrere auch funktionell eingeordnet werden. Pityriacitrin stellt beispielsweise einen potenten UV-Filter aufgrund seiner komplexen Ringstruktur dar und lässt sich durchaus in einen Zusammenhang mit den klinischen Erscheinungen der Hautkrankheit Pityriasis versicolor bringen (Mayser et al. 2002). Pityrialacton verursacht vermutlich die gelb-grüne Fluoreszenz der affizierten Hautareale bei Pityriasis versicolor unter der Wood-Lampe (Mayser et al. 2003). Malassezin hat eine nachweislich apoptotische Wirkung auf humane Melanozyten (Krämer et al. 2005), Pityriarubin kann vor den Effekten des Oxidative Burst schützen, was sich in den nicht entzündeten Arealen der betroffenen Haut widerspiegelt (Irlinger et al. 2004; Krämer et al. 2005; Mayser et al. 2007). Die Komplexität dieser neu beschriebenen Strukturen ließ darauf schließen, dass nicht nur *Malassezia furfur*, die zur Normalflora der menschlichen Haut gezählt wird, zur Bildung von Indolpigmenten befähigt ist.

Nies (2006) konnte Pityriacitrin in 13 *Exophiala*-Isolaten nachweisen, Zuther et al. (2008) gelang die Etablierung eines Tryptophanmetabolismus-Modells anhand von *Ustilago maydis*.

Die Autoren konnten zeigen, dass lediglich der erste Umwandlungsschritt von Tryptophan zu Indolpyruvat durch eine Tryptophan-Aminotransferase (Tam1) katalysiert wird. Gestützt wurde diese These durch die Tatsache, dass Pityriacitrin spontan aus sterilen Lösungen entstand, die nur Tryptophan und Indolpyruvat enthielten. Es wird eine Kondensation beider Stoffe vermutet, die letztendlich über weitere Schritte zur Synthese von Pityriacitrin führt. In Spuren entstand aus Indolpyruvat und Tryptophan auch Pityriarubin C, wie alleinig aus Lösungen, die nur Indolpyruvat enthielten. Pityriarubin C konnte nicht in allen zur Pigmentsynthese befähigten Stämmen von *Ustilago maydis* nachgewiesen werden (Zuther et al. 2008). Des Weiteren wurde in einer Studie das Pigment nur aus dem *Exophiala dermatitidis*-Wildtyp und der Mutante Mel-3, nicht aber aus der Mutante Mel-1, isoliert, was also insgesamt gegen eine spontane Genese dieser Pigmente spricht (Heidrich 2010). Analog dazu fielen die Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit aus. So waren trotz unterschiedlicher Fraktionierung von Wildtyp und seiner melanindefizienten Mutante stets Rückschlüsse auf die einzelnen, wiederholt isolierten Pigmente möglich.

Zusätzlich wurden die beiden Indolalkaloide Exophialin und 8-Hydroxyexophialin im Wildtyp und der Mutante Mel-1 von *Exophiala dermatitidis* strukturell aufgeklärt (Kindler et al. 2010). Beide sind eng miteinander verwandt und unterscheiden sich nur durch eine zusätzliche Hydroxylgruppe des 8-Hydroxyexophialins anstelle des Wasserstoffatoms bei Exophialin an C8 (**Abbildung 7**). Beide werden aus Vorstufen der Biosynthese von 1,8-Dihydroxynaphthalen-Melanin gebildet, welches aus Acetat über 1,3,6,8-Tetrahydroxynaphthalen synthetisiert wird. Mel-1 akkumuliert die beiden aromatischen Pentaketide Scytalon und Flaviolin, da das Enzym, das Scytalon zu 1,3,8-Trihydroxynaphthalen umwandelt, in der Mutante deaktiviert vorliegt. Dabei resultiert das 8-Hydroxyexophialin als Kondensationsprodukt aus Flaviolin mit Indol-3-Essigsäure oder 3-Indolpyruvat. Beim Wildtyp wird vor allem Exophialin und nur in kleinen Mengen 8-Hydroxyexophialin synthetisiert, da Flaviolin im Wildtyp nicht angereichert wird. Anstelle von Flaviolin reagiert beim Wildtyp 2-Hydroxyjuglon mit Indol-3-Essigsäure oder 3-Indolpyruvat zu Exophialin. Beide werden nur dann in ausreichender Menge synthetisiert, wenn Tryptophan dem Medium als alleinige Stickstoffquelle zugesetzt wird. Sie werden sehr wahrscheinlich nicht komplett von hochsubstratspezifischen Enzymen umgesetzt, da vor allem ihr letzter Syntheseschritt eine spontane Knoevenagel-Kondensation zu sein scheint. Dies könnte jedoch von Vorteil für den Pilz *Exophiala dermatitidis* sein, wenn die bioaktiven Pigmente nicht von hochspezifischen Enzymen katalysiert werden, da auf diesem Wege eine Vielzahl von Indolalkaloiden aus 3-Indolpyruvat entstehen kann. Dass es sich bei diesen Pigmenten um Artefakte durch den Aufreinigungsprozess handelt, konnte ausgeschlossen werden, da sie bereits im Rohextrakt nachweisbar waren (Kindler et al. 2010).

Exophialin konnte sowohl bei Heidrich (2010), als auch in dieser Studie im Wildtyp und zusätzlich bei Mel-3 nachgewiesen werden. Reproduzierbar war auch das Pigment Desoxyexophialin bei der Auftrennung der Fraktionen des Wildtyps.

Ziel dieser Arbeit war es, durchflusszytometrisch darzustellen, inwieweit die von *Exophiala dermatitidis* synthetisierten Pigmente einen Einfluss auf das Phagozytoseverhalten humaner neutrophiler Granulozyten im Vollblutansatz ausüben, und anhand dieser möglichst naturgetreuen Situation einer Wirt-Keim-Interaktion einen Beitrag zur Aufklärung der Pathogenität dieses Pilzes zu leisten. Dabei wurden ausschließlich der Wildtyp von *E. dermatitidis* und die Melaninmangelmutante Mel-3 berücksichtigt, da sie sich bereits hinsichtlich des Oxidative Burst als äußerst potent erwiesen hatten (Heidrich 2010). Infektionen mit *Exophiala* gelten in Form von Chromoblastomykosen und Phaeohyphomykosen der Haut als verbreitet. Wenngleich dieser Keim auch zur transienten Hautflora gezählt werden kann (Mok and Baretto da Silva 1984), so ruft er unter bestimmten Umständen doch systemische Erkrankungen hervor, die sich vor allem in einem ausgeprägten Neurotropismus manifestieren (Li et al. 2010). Neueren Fallberichten zufolge sind auch immunkompetente Individuen betroffen (Alabaz et al. 2009; Chang et al. 2009), was einen Mechanismus dieses Pilzes, das Immunsystem seines Wirtes auf hocheffiziente Weise zu unterdrücken, wahrscheinlich macht. Die vorliegende Studie knüpft deshalb an einem sehr frühen Punkt der Infektabwehr an: der Phagozytose.

Das Protokoll zur Phagozytosedarstellung am Durchflusszytometer von Schnitzler et al. (1999) wurde in der Hinsicht modifiziert, dass die Granulozyten selbst zusätzlich über ein monoklonales CD16⁺-Antikörperkonjugat fluorochrommarkiert wurde (Anti-CD16⁺-APC-Antikörper). Da dessen Spezifität für Granulozyten mit einer Blockade der Phagozytose einhergehen kann, wurde er den Ansätzen erst nach Ablauf der Inkubationszeit für die Phagozytose und der angeschlossenen Erythrozytenlyse zugegeben.

Zudem war zuvor über mehrere Titrationsreihen ein optimales Pilz-Granulozyten-Verhältnis geschaffen worden, was eine wichtige Voraussetzung zum regelrechten Verlauf der Phagozytose darstellt. Die Pilzzellen lagen in den Versuchsansätzen stets in einem leichten Überschuss vor, sodass ein Granulozyt 1,5-2 Hefezellen inkorporieren konnte. Bei diesem Verhältnis haben alle Granulozyten die Möglichkeit zu phagozytieren (Martin and Bhakdi 1991). Zur Vermeidung von Pilzzellkonglomeraten wurden beide Stämme zur Vorbereitung auf die Phagozytoseversuche in ein spezielles Flüssigmedium gebracht, welches das Wachstum der Hefeform von *Exophiala* begünstigt (Peltroche-Llacsahuanga et al. 2003) und in dem zugleich eine Bildung von Pigmenten unterbleibt, da Tryptophan nicht als alleinige Stickstoffquelle vorliegt (Mayser et al. 2004). Die Kontrolle der Hefezellen erfolgte stets bei

deren Zellzahlbestimmung pro ml Flüssigkeit unter dem Lichtmikroskop unmittelbar vor den Messungen (**Kapitel 3.2.5**). Die Vereinheitlichung zur Hefeform gewährleistete zudem auch eine gleichmäßige Anfärbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff BCECF. BCECF-AM fluoresziert in seiner Ausgangsform nicht, erst wenn es in vitale Zellen diffundiert, wird es intrazellulär über Esterasen zu BCECF aktiviert und nun aufgrund seiner negativen Ladung in der Zelle zurückgehalten (Platz 2004). Diese Tatsache war in dieser Studie von großem Vorteil, denn so konnten vitale Hefezellen garantiert und einschneidende Veränderungen von Oberflächenmerkmalen des Pilzes ausgeschlossen werden. Um osmotische Schwankungen und damit verbundene morphologische Veränderungen der Hefezellen zu verhindern, waren diese ständig in 0,9 %-iger Kochsalzlösung oder PBS gelöst. Der abschirmende Effekt des Melanins bestätigte sich ebenfalls nach der Anfärbung des Wildtyps mit BCECF (Heidrich 2010).

In zahlreichen älteren Studien wurden isolierte Granulozyten für die Untersuchung der Phagozytose verwendet. Oftmals wurde eine Dichtegradientenseparation vorgeschaltet, die große Blutvolumina nötig machte. Diese Methode geht aber mit einer artifiziellen und im Ausmaß schwer kontrollierbaren Voraktivierung der Granulozyten einher (Podbielski et al. 1996) und beeinflusst erheblich die Interaktionen zwischen Mikroorganismus und Granulozyten (Schnitzler et al. 1995). Zur Vermeidung dieser Voraktivierung wurde in dieser Arbeit stets mit Vollblut gearbeitet. Hierdurch konnten annähernd physiologische Bedingungen geschaffen werden, da die Blutzellen im Vollblut kaum Manipulationen unterliegen. Um weitere Einflussfaktoren zu minimieren, wurde das Blut nach Abnahme sofort mit den gefärbten Hefezellen bei 37°C inkubiert und anschließend mit dem CD16⁺-APC-Antikörper versehen. Zur Verhinderung der Gerinnung waren den Blutentnahmeröhrchen 10 I.E. Heparin pro ml Blut zugesetzt. Inhibitorische Effekte des Heparins auf das Ausmaß der Phagozytose konnten in dieser Konzentration ausgeschlossen werden, da sich diese erst bei einer Menge von ca. 50 I.E./ml Blut entfalten (Salih et al. 1997). Für die einzelnen Messungen wurden stets Blutproben von verschiedenen Spendern benutzt, um probandenabhängige Effekte zu vermeiden. Pro Messung wurden immer 50.000 Partikel erfasst, was eine quantifizierende Aussage sicherstellte. Gleichzeitig wurde bei der statistischen Auswertung der Daten darauf geachtet, dass bei Messwiederholungen verschiedener Blutproben ein gemischtes Modell mit zufälligem Faktor „Blutprobe“ Anwendung fand. Insgesamt konnte auf diese Weise die Schwankungsbreite der Granulozyten weitestgehend standardisiert werden. Die Verwendung von kleinen Blutvolumina (100 µl) in Eppendorfgefäßen ermöglichte eine hohe Kontaktmöglichkeit zwischen den Granulozyten und den Pilzen. Zur Homogenisierung der Proben wurde ein Thermomixer bei 37°C verwendet, um weitestgehend *in vivo*-Verhältnisse zu schaffen.

Versuche, die Messungen basierend auf dem Phagozytoseprotokoll der RWTH Aachen durchzuführen, schlugen im Vorfeld bereits fehl (Heidrich 2010). Die Einteilung der Dotplot-Darstellung wurde in der vorliegenden Arbeit so gewählt, dass die grün fluoreszierenden Hefepilze in einem von den im roten Bereich fluoreszierenden Granulozyten separaten Quadranten zu liegen kamen. Dabei wurde die Abszisse mit dem Fluoreszenzkanal für BCECF belegt, die Ordinate mit dem APC-Signal (**Abbildung 14**). Es wurde explizit darauf geachtet, dass sich die beiden gewählten Farbstoffe bezüglich ihrer Emissionsspektren nicht überlappen. Auf diese Weise war zu allen Zeitpunkten der Messungen anhand der Fluoreszenzen eine klare Abgrenzung von Granulozyten, die noch nicht phagozytiert hatten (rote Fluoreszenz, Q1), von solchen, die bereits Hefezellen inkorporiert hatten (gemischt grün-rote Fluoreszenz, Q2) und den noch freien, nicht phagozytierten Hefezellen (grüne Fluoreszenz, Q4) möglich.

Die Frage, ob es sich um eine „echte“ Phagozytose oder aber nur um eine rein adhäsive Assoziation der Pilzzellen an die Granulozyten handelt, ergab sich während den Messungen. Im Durchflusszytometer führt jede Form der Assoziation der BCECF-gefärbten Pilzzellen mit den APC-markierten Granulozyten zu einer Überlagerung der Fluoreszenzen und damit zur Verschiebung der Zellen in den der statistischen Berechnung zugrundeliegenden Quadranten Q2. Daher kann mit den durchflusszytometrischen Messungen keine Aussage über intra- (echte Phagozytose, Internalisierung) beziehungsweise extragranulozytäre (Adhäsion) Lage der Hefezellen gemacht werden. Die Unterbindung einer Adhäsion konnte über den Zusatz einer 4%-igen Paraformaldehydlösung zum Kontrollansatz erzielt werden. Es stellte somit eine sehr gute Negativkontrolle dar, da die Quervernetzung der granulozytären Oberflächenrezeptoren jegliche Form der Bindung der Pilzzellen unmöglich macht. Über mehrere Waschschrte, die nach erfolgter Inkubationszeit und zwischen den Färbungen durchgeführt wurden, können unspezifische Bindungen zwischen den Granulozyten und Pilzzellen ausgeschlossen werden.

Zum Ausschluß einer extrazellulären Lage der Hefen wurde stichprobenhaft an einem Konfokalmikroskop der Versuch unternommen, deren genaue Lokalisation zu bestimmen. Der limitierende Faktor war dabei das BCECF der gefärbten Hefen, das sämtliche Fluoreszenzkanäle des Mikroskops überstrahlte. Umgekehrt konnte die Anfärbung nicht unterbleiben, da die erfolgte Phagozytose zunächst am Durchflusszytometer gemessen werden musste, um im direkten Anschluss von den gemessenen Proben Ausstriche anfertigen zu können. Erst eine Darstellung im Lichtmikroskop nach Giemsaefärbung der Ausstriche bestätigte die intrazelluläre Lage der Pilze. Diese war auch schon früher via

Interferenzkontrastmikroskopie dargestellt worden (Platz 2004).

Zudem stützen die Untersuchungen in der vorausgehenden Arbeit von Heidrich (2010) bezüglich der Wirkung von *Exophiala dermatitidis* auf den Oxidative Burst die Annahme, dass es sich bei den hier erbrachten Ergebnissen um eine echte Phagozytose handelt. Die Auslösung des oxidativen Burst, der intragranulozytär und sauerstoffabhängig verläuft, kann als ein sicherer Beweis für die ihm vorgeschaltete Phagozytose angesehen werden. Diese ist vorab nötig, um nach der Internalisierung der Hefezellen die Fusion von Phago- und Lysosom zum Phagolysosom zu bewirken (**Kapitel 1.2.3**).

Stets war reproduzierbar, dass die Kontrollansätze (Mel-3 + Vollblut) nach 0 Minuten den höchsten Prozentsatz der Zellen in Q2 aufwiesen. Hier könnte es sich initial um überwiegend adhärente Zellen an den Granulozyten handeln. Die Beobachtungen von Heidrich (2010), dass bereits nach wenigen Sekunden Burst-Aktivitäten nachweisbar waren, sprechen allerdings dagegen. Im weiteren Zeitverlauf konnte dann ein leichter Abfall der phagozytierten Zellen gegenüber dem 0-Minutenwert festgestellt werden, der sich dann nach 60 Minuten einpendelte.

Bei der Auswertung dieser Arbeit diente deshalb bei allen Messungen der gesamte prozentuale Anteil der Zellen, die sich zu unterschiedlichen Inkubationszeiten in Q2 befanden, als Maß für die Phagozytose. Dies wiederum ermöglichte die genaue Beurteilung eines Einflusses der Tryptophanpigmente auf das Phagozytoseverhalten der Granulozyten, die in dieser Studie erstmals erfolgreich durchgeführt werden konnte.

Zunächst konnte gezeigt werden, dass der Wildtyp im direkten Vergleich mit der Mutante Mel-3 in geringerem Ausmaß phagozytiert wurde, was jedoch nicht von statistischer Signifikanz war (**Abbildung 21**). Dies widerspricht den Ergebnissen von Peltroche-Llacsahuanga et al. (2003), die zwar eine schützende Wirkung des Melanins vor dem Killing, jedoch bezüglich der Phagozytose keinen inhibierenden Effekt aufzeigen konnten. Im Vorfeld konnte seine Schutzwirkung vor dem Oxidative Burst beim Wildtyp bereits nach wenigen Minuten Inkubation belegt werden (Heidrich 2010).

Bei der Untersuchung über den Einfluss der Rohextrakte beider Stämme trat das Problem auf, dass der darin enthaltene Lösungsvermittler DMSO - anders als bei Heidrich - bereits per se zu einer signifikanten Hemmung der Phagozytose führte (**Abbildung 28**). Dieses Ergebnis war reproduzierbar. DMSO findet sowohl in der Human- als auch in der Tiermedizin als antiphlogistisches Therapeutikum Anwendung (Frey and Löscher 2002). Dies spricht ebenfalls für den tatsächlichen Ablauf der Phagozytose, der bei Zusatz von DMSO unterbunden wird.

Es scheint unter anderem die Migration von Entzündungszellen zu reduzieren und zeichnet sich aufgrund seines amphiphilen Charakters durch schnelle Penetration über biologische Membranen aus. Sein therapeutischer Einsatz wird aufgrund unerwünschter Nebenwirkungen kontrovers diskutiert (Santos et al. 2003). Da es in der vorliegenden Studie 5%-ig zu den Versuchsansätzen zugegeben wurde, ist der bekannte zytotoxische Effekt aufgrund höherer Konzentrationen ausgeschlossen. Außerdem waren die Zellen weiterhin im Durchflusszytometer zu detektieren. Daraus resultierte jedoch, dass mit den in DMSO gelösten Rohextrakten der beiden Stämme nicht weitergearbeitet werden konnte.

Als weiteres Lösungsmittel wurde Methanol eingesetzt, das keinen signifikant hemmenden Einfluss auf die Phagozytose besitzt (**Abbildung 29**). Allen sich anschließenden Untersuchungen wurden einheitlich 3 μ l Methanol-Pigmentgemisch zugegeben, um Abweichungen im Phagozytoseverhalten der Granulozyten entsprechend als alleinigen Einfluss der Indolalkaloide bewerten zu können. Zusätzlich diente ein Ansatz mit der alleinigen Zugabe von Methanol in jeder Versuchsreihe als Kontrolle. Die anschließenden Untersuchungen zum Einfluss der Fraktionen auf die Phagozytose zeigten, dass die des Wildtyps keine signifikanten Tendenzen zu deren Hemmung aufweisen. Betrachtet man **Abbildung 30**, kann sogar von einer Phagozytosesteigerung im Vergleich zur Kontrolle ausgegangen werden. Vermutlich steigert der Pilz zunächst das Phagozytoseverhalten der Granulozyten, um sich dann durch das eingelagerte Melanin vor dem Burst hocheffizient zu schützen. Dies könnte ein möglicher Pathogenitätsfaktor sein. Die Melaninmangelmutante Mel-3 zeigte bereits beim Zusatz der gepoolten Fraktionen F1-F3 und F4-F10 einen stark hemmenden Einfluss in Form eines Zellzahlrückgangs im Auswertungsquadranten Q2. Jedoch war dieser nur bei den Fraktionen F1-F3 von signifikanter Bedeutung. Bei der Vereinzelung der Fraktionen trat die Fraktion 2 deutlich in den Vordergrund. Im zeitlichen Verlauf konnte eine starke Zellreduktion in Q2 festgestellt werden. **Abbildung 34** und **35** demonstrieren den zytotoxischen Effekt der gesamten Fraktion 2. Dieser ist eindeutig im zeitlichen Verlauf zu konstatieren. Zusätzliche Untersuchungen zu konzentrationsabhängigen Effekten, wie z.B. einen LDH-Zytotoxizitätsassay, sind im Rahmen dieser Studie nicht durchgeführt worden.

In der sich anschließenden dünnschichtchromatographischen Auftragung von Fraktion 2 wurde eine Aufteilung in fünf Banden vorgenommen (**Abbildung 36**). Es konnte gezeigt werden, dass lediglich die Pigmente, die sich in Bande 1 und Bande 3 befanden, für eine zytotoxische Aktivität verantwortlich gemacht werden konnten. Nachweislich waren in den Dotplotdarstellungen unter Einfluss der Banden 2 (R_f –Wert: 0,12), 4 (R_f –Wert: 0,75) und 5 (R_f –Wert: 1) stets Granulozyten und Pilze zu detektieren (**Abbildung 38**). Dies spricht für

eine tatsächliche Hemmung der Phagozytose durch die Banden 2, 4 und 5 der Fraktion 2. Bereits in Untersuchungen zum Oxidative Burst übte die Fraktion 2 der melanindefizienten Mutante Mel-3 einen hemmenden Effekt aus (Heidrich 2010). Mit den hier erzielten Erkenntnissen kann davon ausgegangen werden, dass durch die Pigmente dieser Fraktion offenbar eine hocheffektive, synergistische Hemmung von Phagozytose und Oxidative Burst und teilweise auch Zytotoxizität erzielt wird. Für den Pilz macht es durchaus Sinn, sich durch eine Vielzahl unterschiedlicher Pigmente gegen die verschiedenen Abwehrmechanismen- wie Phagozytose und Burst- zu schützen, um die Infektabwehr in effizienter Weise zu umgehen. *Exophiala dermatitidis* spiegelt diese These durch eine enorme Pigmentsynthese wider.

Die anthrazitfarbene Bande der Fraktion 6 besaß offenbar keine Relevanz bezüglich der Phagozytose. Sie wurde in dieser Studie pauschal in Form eines gepoolten Pigmentgemisches (F4-F10) in zwei Phagozytosemessungen untersucht und zeigte keinen hemmenden Einfluss auf die Phagozytoseleistung der neutrophilen Granulozyten. Sie scheint alleinig in der Hemmung der ROS-Synthese eine herausragende Rolle zu spielen (Heidrich 2010). Eine strukturelle Aufklärung dieses Hemmstoffes konnte aufgrund einer nach wie vor zu geringen Ausbeute des nur in Spuren synthetisierten Pigmentes nicht erfolgen.

Ähnlich verhielt es sich bezüglich der weiteren Aufreinigung der einzelnen Banden von Sephadex-Fraktion 2 via HPLC. Es konnte bei der anschließenden Zugabe kein Effekt mehr erzielt werden, da bereits die Ausgangsmengen für die HPLC minimal waren. Diese Beobachtungen sprechen dafür, dass der Pilz durch die Produktion von minimalen Pigmentmengen hocheffektive Schutzmechanismen entwickelt.

Die im Rahmen dieser experimentellen Studie erworbenen Erkenntnisse bieten ein Anschauungsmodell für die potente Schutzwirkung einzelner von *Exophiala dermatitidis* gebildeter Pigmente vor der Phagozytose durch neutrophile Granulozyten, die eine erste Barrierefunktion in der klinischen Infektabwehr besitzen. Die Melaninmangelmутante Mel-3 weist zwar einen kompletten Defekt hinsichtlich der Melaninbildung auf, dennoch ist der unpigmentierte Pilz in der Lage, gleiche neurologische Symptome im Tierversuch auszulösen wie der als virulenter eingestufte Wildtyp (Calvo et al. 2010). Ein Grund dafür könnte auf die hochpotente Unterdrückung der phagozytären Aktivität der Granulozyten zurückgeführt werden, die in der vorliegenden Arbeit registriert wurde. Mit der hier etablierten Methode zur Darstellung der Phagozytose bieten sich darüber hinaus weitere diesbezügliche Untersuchungen über die Wirksamkeitsprüfung von durch pathogene Pilze erzeugter Stoffwechselprodukte an.

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden explorativen Studie am Durchflusszytometer wurde der Einfluss der von *Exophiala dermatitidis* synthetisierten Pigmente auf das Phagozytoseverhalten humaner neutrophiler Granulozyten im Vollblutansatz untersucht.

Basierend auf den Beobachtungen von Mayser et al. (1998), dass der Hefepilz *Malassezia furfur* auf einem Minimalagar, dem alleinig Tryptophan als Stickstoffquelle zugesetzt war, unterschiedliche Indolderivate zu bilden vermochte, wurde mittlerweile bei diversen, auch phylogenetisch weit voneinander entfernten Pilzen- wie beispielsweise *Exophiala dermatitidis*- die Fähigkeit zur Pigmentsynthese beschrieben (Nies 2006; Mayser et al. 2007; Heidrich 2010). Diese Untersuchungen führten zur Aufklärung einiger bis dato noch unbekannter Mechanismen, die im Rahmen der Pathogenese von Infektionen durch derartige Pilze von Bedeutung sein können. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den möglichen Einfluss der von zwei *Exophiala dermatitidis*-Stämmen gebildeten Tryptophanstoffwechselpigmente auf die Phagozytose zu untersuchen und damit Einblicke in ihre eventuelle pathogenetische Wirkung zu bekommen.

Dazu wurden der Wildtyp von *Exophiala dermatitidis* und seine Melaninmangelmutante Mel-3 zur Pigmentinduktion auf 1b-Agar verbracht. Nach der vierwöchigen Inkubation wurden die Pigmente in Form von Rohextrakt aus dem Agar gelöst. Anschließend erfolgte deren Aufreinigung via Säulen- und Dünnschichtchromatographie. Das von Schnitzler et al. bereits 1999 eruierte Protokoll zur Phagozytoseuntersuchung im Vollblutansatz wurde stark modifiziert, um den Fragestellungen dieser Studie gerecht zu werden. So wurden die Granulozyten zusätzlich mit einem CD16⁺-APC-Antikörper markiert, um sie bei den Messungen im Durchflusszytometer detektieren zu können. Eine Hemmung der Phagozytoseleistung der Granulozyten durch die protektive Wirkung des in der Zellwand des Wildtyps eingelagerten Melanins konnte im Vergleich zu seiner Mutante Mel-3 in einem Vorversuch festgestellt werden.

Es konnte gezeigt werden, dass der Einsatz von DMSO als Lösungsvermittler für den Rohextrakt bereits per se eine inhibitorische Wirkung auf die Phagozytose entfaltet. Weiterführende Messserien mit gepoolten, in Methanol gelösten Sephadex-Fractionen beider Stämme ergaben, dass die des Wildtyps nicht zu einer signifikanten Hemmung der Phagozytose führen. Bei der Melaninmangelmutante Mel-3 zeigten die gepoolten Fraktionen 1 bis 3 bereits nach 10-minütiger Inkubationszeit eine signifikante Hemmung der Phagozytose.

Nach Vereinzelung der drei Fraktionen konnte Fraktion 2 für diese Hemmung verantwortlich gemacht werden. Mittels Dünnschichtchromatographie der Fraktion 2 wurde eine Aufteilung in fünf Banden vorgenommen. In diesem Bereich liegen keine bisher bekannten Tryptophanpigmente, die Fraktion 2 war jedoch bereits in vorgeschalteten Untersuchungen zum Oxidative Burst hemmend in Erscheinung getreten (Heidrich 2010). Die signifikante Hemmung der Phagozytose konnte durch die Banden 2, 4 und 5 verzeichnet werden. Die zusätzlich in diesem System untersuchte Reinsubstanz Pityriazol aus *Malassezia furfur* besaß zu keinem untersuchten Zeitpunkt einen signifikanten Einfluss auf die Phagozytose von *Exophiala dermatitidis*-Mel-3 durch neutrophile Granulozyten.

Das gepoolte Pigmentgemisch der Sephadex-Fractionen 4–10 trat in Bezug auf die Phagozytose nicht als signifikant hemmend in Erscheinung. Das darin enthaltene „Anthrazit“ (in Fraktion 6) besitzt demnach nur hinsichtlich des oxidativen Burst Relevanz (Heidrich 2010). Seine strukturelle Aufklärung gelang aufgrund einer nach wie vor zu geringen Ausbeute nicht.

Insgesamt wiesen beide Stämme von *Exophiala dermatitidis* ein zuverlässig reproduzierbares, großes Spektrum an Tryptophanpigmenten auf, die in Form von aufgereinigten Säulenchromatographie-Fractionen und Einzelbanden eine Hemmung der Phagozytose induzierten. Sie spielen somit möglicherweise eine bedeutende Rolle als Pathogenitätsfaktoren im Rahmen von *Exophiala dermatitidis*-Infektionen bei Mensch und Tier.

7 Summary

The current explorative study is a flow cytometric analysis which examines the influence of the pigments synthesized by *Exophiala dermatitidis* on phagocytosis of human neutrophil granulocytes in a whole blood assay.

Based on the observations of Mayser et al. (1998) showing that the yeast *Malassezia furfur* was able to generate different indole derivatives by cultivating on a medium only added tryptophan as the single nitrogen source, the capacity to synthesize pigments was meanwhile described of diverse, phylogenetic not related fungi such as *Exophiala dermatitidis* (Nies 2006; Mayser et al. 2007; Heidrich 2010). This fact resulted in clarification of some recently unknown mechanisms that could play an important role concerning the pathogenesis of these fungi. The aim of the current study was to explore a potential influence of tryptophan pigments synthesized by two strains of *Exophiala dermatitidis* on the phagocytosis obtaining knowledges about its eventual pathogenic mechanisms.

Therefore the wildtype of *Exophiala dermatitidis* and its mutant Mel-3 were applied on 1b-agar, in order to induce the pigments. After an incubation of four weeks the pigments were dispensed as raw extract followed by their purification via column and thin layer chromatography. The protocol established already in 1999 by Schnitzler et al. about the exploration of phagocytosis in a whole blood assay was strongly modified reaching the thesis of this study. Therefore the granulocytes were additionally marked by a CD16⁺-APC-antibody in order to be able to detect them while measuring in the flow cytometric analysis. An inhibition regarding the phagocytosis activity of the granulocytes due to the protective effect of the melanin located in the wildtype-cellwall could be explored in contrast to its mutant Mel-3 in a previous test.

Using DMSO as a solvent for the raw extract it could be shown that it already develops per se an inhibitory effect on phagocytosis. Further experimental series with pooled sephadex-fractions of both strains which were dissolved in methanol demonstrated that those of the wildtype could not inhibit the phagocytosis in a significant way. The pooled fractions 1 to 3 of the melanin deficient mutant Mel-3 displayed already ten minutes after incubation a significant inhibition of the phagocytosis. After separating the three fractions it could be indicated that fraction 2 was responsible for that inhibition. Fraction 2 was partitioned by preparative thin layer chromatography into five bands. This area does not include any up to now known tryptophan pigments, though fraction 2 equally appeared to be inhibitory concerning oxidative burst in former studies (Heidrich 2010). This significant inhibition of phagocytosis could be

observed owing to the bands 2, 4 and 5. Further examination of the pure substance Pityriazol isolated from *Malassezia furfur* did not possess any significant influence on the phagocytosis at none of the explored time levels.

The pooled mixture of pigments out of the sephadex-fractions 4 to 10 did not appear in an inhibitory way concerning phagocytosis. The pigment "Anthrazit", which is included in fraction 6, is therefore just relevant regarding the oxidative burst (Heidrich 2010). Its structural clarification did not succeed due to an underdosed rate of yield.

In summary it could be demonstrated that both strains of *Exophiala dermatitidis* offer a reliable reproduceable, large spectrum of tryptophan pigments, which induced an inhibition of phagocytosis when added as purified column chromatographic fractions and single bands. Therefore they possibly have a significant impact as factors of pathogenity considering *Exophiala dermatitidis*-infections, both in human beings and animals.

8 Literaturverzeichnis

Alabaz D., Kibar F., Arikan S., Sancak B., Celik U., Ksaray N., Turgut M. (2009) Systemic phaeohyphomycosis due to *Exophiala (Wangiella)* in an immunocompetent child. *Med. Mycol.* 47(6): 653-657.

Al-Tawfiq J.A. and Amr S.S. (2009) Madura leg due to *Exophiala jeanselmei* successfully treated with surgery and itraconazole therapy. *Med. Mycol.* 47(6): 648-652.

Antonucci A., Ghetti P., Iozzo I. (2008) Recurrent subcutaneous phaeohyphomycosis caused by *Exophiala sp.* associated with squamocellular carcinoma. *Int. J. Dermatol.* 47(12): 1323-1324.

Badali H., Najafzadeh M.J., Van Esbroeck M., van den Enden E., Tarazooie B., Meis J.F., de Hoog G.S. (2009) The clinical spectrum of *Exophiala jeanselmei*, with a case report and in vitro antifungal susceptibility of the species. *Med. Mycol.* 47(1): 1-10.

Brandt M.E. and Warnock D.W. (2003) Epidemiology, clinical manifestations, and therapy of infections caused by dematiaceous fungi. *J. Chemother. Suppl.*: 36-47.

Calvo E., Rodriguez M.M., Mariné M., Mayayo E., Pastor F.J., Guarro J. (2010) Comparative virulence of three species of *Exophiala* in mice. *Med. Mycol.* 48(6): 853-857.

Chakrabarti A. (2007) Epidemiology of central nervous system mycoses. *Neurol. India.* 55(3): 191-197.

Chang C.L., Kim D.S., Park D.J., Kim H.J., Lee C.H., Shin J.H. (2000) Acute cerebral phaeohyphomycosis due to *Wangiella dermatitidis* accompanied by cerebrospinal fluid eosinophilia. *J. Clin. Microbiol.* 38(5): 1965-1966.

Chang X., Li R., Yu J., Bao X., Qin J. (2009) Phaeohyphomycosis of the central nervous system caused by *Exophiala dermatitidis* in a 3-year-old immunocompetent host. *J. Child. Neurol.* 24(3): 342-345.

Darai G., Handermann M., Hinz E., Sonntag H.-G. (2003) Lexikon der Infektionskrankheiten des Menschen. Springer, 2. Auflage, S.511 ff.

Deepe G.S. and Bullock W.E. (1990) Immunological aspects of fungal pathogenesis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 9(8): 567-579.

de Hoog G.S. and Hermanides-Nijhof E.J. (1977) The black yeasts and allied hyphomycetes. *Studies in Mycology* 15. Baarn (NL): Centraalbureau voor Schimmelcultures.

de Hoog G.S. and Haase G. (1993) Nutritional physiology and selective isolation of *Exophiala dermatitidis*. *Antonie van Leeuwenhoek.* 64(1): 17-26.

de Hoog G.S., Takeo K., Yoshida S., Gottlich E., Nishimura K., Miyaji M. (1994) Pleoanamorphic life cycle of *Exophiala (Wangiella) dermatitidis*. *Antonie van Leeuwenhoek.* 65: 143-153.

de Hoog G.S., Guarro J., Gené M.J., Figueras M.J. (2000) Atlas of clinical fungi, 2nd Edition. Baarn (NL): Centraalbureau voor Schimmelcultures.

de Hoog G.S., Matos T., Sudhadham M., Luijsterburg K.F., Haase G. (2005) Intestinal prevalence of the neurotropic black yeast *Exophiala (Wangiella) dermatitidis* in healthy and impaired individuals. *Mycoses* 48(2): 142-145.

Diamond R.D. (1993) Interactions of phagocytic cells with *Candida* and other opportunistic fungi. *Arch. Med. Res.* 24(4): 361-369.

Dixon D.M., Shadomy H.J., Shadomy S. (1980) Dematiaceous fungal pathogens isolated from nature. *Mycopathologia* 70: 153-161.

Dixon D.M., Polak A., Szaniszlo P.J. (1987) Pathogenicity and virulence of wild-type and melanin-deficient *Wangiella dermatitidis*. *J. Med. Vet. Mycol.* 25: 97-106.

Dixon D.M., Polak A., Conner G.W. (1989) Mel-mutants of *Wangiella dermatitidis* in mice: evaluation of multiple mouse and fungal strains. *J. Med. Vet. Mycol.* 27(5): 335-341.

Dixon D.M., Migliozi J., Cooper C.R. Jr., Solis O., Breslin B., Szaniszlo P.J. (1992) Melanized and non-melanized multicellular form mutants of *Wangiella dermatitidis* in mice: mortality and histopathology studies. *Mycoses.* 35(1-2): 17-21.

Espinel-Ingroff A., Kerkering T.M., Shadomy H.J. (1982) Isolation of dematiaceous pathogenic fungi from a feed and seed warehouse. *J.Clin. Microbiol.* 15: 714-719.

Etzioni A. (1999) Integrins- the glue of life. *Lancet* 353: 341-343.

Ezzine-Sebaï N., Benmously R., Fazaa B., Chaker E., Zermani R., Kamoun M.R. (2005) Chromomycosis arising in a Tunisian man. *Dermatol. Online J.* 11(2): 14.

Feng B., Wang X., Hauser M., Kaufmann S., Jentsch S., Haase G., Becker J.M., Szaniszló P.J. (2001) Molecular cloning and characterization of WdPKS1, a gene involved in dihydroxynaphthalene melanin biosynthesis and virulence in *Wangiella (Exophiala) dermatitidis*. *Infect. Immun.* 69: 1781-1794.

Forke R., Jäger A., Knölker H.J. (2008) First total synthesis of clausine L and pityriazole, a metabolite of the human pathogenic yeast *Malassezia furfur*. *Org. Biomol. Chem.* 6(14): 2481-2483.

Fraser I.P., Koziel H., Ezekowitz R.A. (1998) The serum mannose-binding protein and the macrophage mannose receptor are pattern recognition molecules that link innate and adaptive immunity. *Semin. Immunol.* 10(5): 363-372.

Frey H.H. and Löscher W. (2002) Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin. Enke. S.339 f.

Gabhane S.K., Gangane N., Anshu. (2008) Cytodiagnosis of eumycotic mycetoma: a case report. *Acta Cytol.* 52(3): 354-356.

Galor A., Karp C.L., Forster R.K., Dubovy S.R., Gaunt M.L., Miller D. (2009) Subconjunctival mycetoma after sub-Tenon's corticosteroid injection. *Cornea.* 28(8): 933-935.

Garcia-Martos P., Márquez A., Gené J. (2002) Human infections by black yeasts of genus *Exophiala*. *Rev. Iberoam. Micol.* 19(2): 72-79.

Greenwood N.N. and Earnshaw A. (1990) Chemie der Elemente, 1. Auflage, VCH Weinheim, Basel, Cambridge, New York. S.1202.

Hamilton A.J. and Holdom M.D. (1999) Antioxidant systems in the pathogenic fungi of man and their role in virulence. *Med. Mycol.* 37:375-389.

Hamilton A.J. and Gomez B.L. (2002) Melanins in fungal pathogens. *J. Med. Microbiol.* 51:189-191.

Harler M.B., Wakshull E., Filardo E.J., Albina J.E., Reichner J.S. (1999) Promotion of neutrophil chemotaxis through differential regulation of beta 1 and beta 2 integrins. *J. Immunol.* 162: 6792-6799.

Heidrich F.M. (2010) Pigmentsynthese bei *Exophiala dermatitidis*: Einfluss auf Phagozytose und Oxidative Burst. Dissertation. (GENERIC) Ref Type:Generic

Helms S.R. and McLeod C.G. (2000) Systemic *Exophiala jeanselmei* infection in a cat. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 217(12): 1858-1861.

Hesse M. (2000) Alkaloide, Helvetica Chimica Acta; 1. Auflage, S.14 ff.

Husemann J., Loike J.D., Anankov R., Febbrato M., Silverstein S.C. (2002) Scavenger receptors in neuropathology: their role on microglia and other cells of the nervous system. *Glia.* 40(2): 195-205.

Irlinger B., Krämer H.J., Mayser P., Steglich W. (2004) Pityriarubins, biologically active bis(indolyl)spirans from cultures of the lipophilic yeast *Malassezia furfur*. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 43:1098-1100.

Jacobson E.S. (2000) Pathogenic roles of fungal melanins. *Clin Microbiol Rev* 13: 708-717.

Janeway C.A., Travers P., Walport M., Walport S.M. (2002) Immunologie. 5.Auflage, Heidelberg Berlin, Spektrum Akademischer Verlag GmbH.

Juncu C.G. (2007) Synthese von Melanin und Pityriacitrin bei *Exophiala dermatitidis*: Ein Vergleich zweier UV-protektiver Substanzen. Dissertation. (GENERIC) Ref Type: Generic

Kano R., Kusuda M., Nakamura Y., Waranabe S., Tsujimoto H., Hasegawa A. (2000) First isolation of *Exophiala dermatitidis* from a dog: identification by molecular analysis *Vet. Microbiol.* 76(2): 201-205.

Kayser F.H., Bienz K., Eckert J., Zinkernagel R.M. (1998) Medizinische Mikrobiologie, 9. Auflage, Thieme. S.19 ff.

Kettlewell P., McGinnis M.R., Wilkinson G.T. (1989) Phaeohyphomycosis caused by *Exophiala spinifera* in two cats. *J.Med .Vet. Mycol.* 27(4): 257-264.

Khardori N. (1989) Host-parasite interaction in fungal infections. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 8(4): 331-351.

Kindler B.L.J., Krämer H.J., Nies S., Gradicsky P., Haase G., Mayser P., Spiteller M., Spiteller P. (2010) Generation of Indole Alkaloids in the Human-Pathogenic Fungus *Exophiala dermatitidis*. *Eur. J.Org. Chem.* 11: 2084-2090.

Kondo M., Hiruma M., Nishioka Y., Mayuzumi N., Mochida K., Ikeda S., Ogawa H. (2005) A case of chromomycosis caused by *Fonsecaea pedrosoi* and a review of reported cases of dematiaceous fungal infection in Japan. *Mycoses* 48(3): 221-225.

Krämer H.J., Kessler D., Hipler U.C., Irlinger B., Hort W., Bödeker R.H., Steglich W., Mayser P. (2005a) Pityriarubins, novel highly selective inhibitors of respiratory burst from cultures of the yeast *Malassezia furfur*: comparison with the bisindolylmaleimide arcyriarubin A. *Chembiochem.* 6: 2290-2297.

Krämer H.J., Podobinska M., Bartsch A., Battmann A., Thoma W., Bernd A., Kummer W., Irlinger B., Steglich W., Mayser P. (2005b) Malassezin, a novel agonist of the aryl hydrocarbon receptor from the yeast *Malassezia furfur*, induces apoptosis in primary human melanocytes. *Chem. Biochem* 6: 860-865.

Kusenbach G., Skopnik H., Haase G., Friedrichs F., Döhmen H. (1992) *Exophiala dermatitidis* pneumonia in cystic fibrosis. *Eur. J. Pediatr.* 151(5): 344-346.

Langfelder K., Streibel M., Jahn B., Haase G., Brakhage A.A. (2003) Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. *Fungal Genet. Biol.* 38: 143-158.

Levitz S.M. (1992) Overview of host defenses in fungal infections. *Clin. Infect. Dis.* 14: 37-42.

Li D.M., Li R.Y., de Hoog G.S., Sudhadham M., Wang D.L. (2010) Fatal *Exophiala* infections in China, with a report of seven cases. *Mycoses* 10: 1439-0507.

Machowinski A., Krämer H.J., Hort, W., Mayser P. (2006) Pityriacitrin-a potent UV filter produced by *Malassezia furfur* and its effect on human skin microflora. *Mycoses* 49: 388-392.

Maeda H., Shibuya H., Yamaguchi Y., Miyoshi T., Irie M., Sato T. (2008) Feline digital phaeohyphomycosis due to *Exophiala jeanselmei*. *J. Vet. Med. Sci.* 70(12): 1395-1397.

Mansour M.K. and Levitz S.M. (2002) Interactions of fungi with phagocytes. *Curr. Opin. Microbiol.* 5(4): 359-365.

Martin E. and Bhakdi S. (1991) Quantitative analyses of opsonophagocytosis and of killing of *Candida albicans* by human peripheral blood leukocytes by using flow cytometry. *J. Clin. Microbiol.* 29(9): 2013-2023.

Matos T., de Hoog G., de Berer A.G., de Crom I., Haase G. (2002) High prevalence of the neurotrope *Exophiala dermatitidis* and related oligotrophic black yeasts in sauna facilities. *Mycoses* 45(9-10): 372-377.

Mayser P., Gründer K., Qadripur S., Köhn F.M., Schill W.B., de Hoog G.S. (1996) Diagnosis, clinical aspects and therapy of early chromoblastomycosis in a case example. *Hautarzt* 47(9): 693-700.

Mayser P., Wille G., Imkampe A., Thoma W., Arnold N., Monsees T. (1998) Synthesis of fluorochromes and pigments in *Malassezia furfur* by use of tryptophan as the single nitrogen source. *Mycoses* 41: 265-271.

Mayser P., Schäfer U., Krämer H.J., Irlinger B., Steglich W. (2002) Pityriacitrin-an ultraviolet-absorbing indole alkaloid from the yeast *Malassezia furfur*. *Arch. Dermatol. Res.* 294: 131-134.

Mayser P., Stapelkamp H., Krämer H.J., Podobinska M., Wallbott W., Irlinger B., Steglich W. (2003) Pityrialactone-a new fluorochrome from the tryptophan metabolism of *Malassezia furfur*. *Antonie van Leeuwenhoek* 84: 185-191.

Mayser P., Tows A., Krämer H.J., Weiss R. (2004) Further characterization of pigment-producing *Malassezia* strains. *Mycoses* 47(1-2): 34-39.

Mayser P., Wenzel M., Krämer H.J., Kindler B.L., Spitteller P., Haase G. (2007) Production of indole pigments by *Candida glabrata*. *Med. Mycol.* 45(6): 519-524.

Meves A. (2006) Intensivkurs Dermatologie. Urban&Fischer. ELSEVIER, S.132 f.

Mok W.Y. and Luizão R.C. (1981) Serological analysis and pathogenic potentials of *Wangiella dermatitidis* isolated from bats. *Mycopathologia* 73(2): 93-99.

Mok W.Y. and Baretto da Silva M.S. (1984) Mycoflora of the human dermal surfaces. *Can. J. Microbiol.* 30(10): 1205-1209.

Mutotoe-Okafor F.A. and Gugnani H.C. (1993) Isolation of *Lecythophora mutabilis* and *Wangiella dermatitidis* from the fruit eating bat, Eidolon helvum. *Mycopathologia* 122(2): 95-100.

Naka W., Harada T., Nishikawa T., Fukushiro R. (1986) A case of chromoblastomycosis: with special reference to the mycology of the isolated *Exophiala jeanselmei*. *Mykosen* 29(10): 445-452.

Nies S.M. (2006) Tryptophanabhängige Synthese von indolhaltigen Pigmenten bei verschiedenen humanpathogenen Asco- und Basidiomyceten. Dissertation.(GENERIC) Ref Type: Generic

Nishimura K. and Miyaji M. (1982) Studies on a saprophyte of *Exophiala dermatitidis* isolated from humidifier. *Mycopathologia* 77(3): 173-181.

Nishimura K., Miyaji M., Taguchi H., Tanaka R. (1987) Fungi in bathwater and sludge of bathroom drainpipes. 1. Frequent isolation of *Exophiala* species. *Mycopathologia* 97(1): 17-23.

Oztas E., Odemis B., Kekilli M., Kurt M., Dinc B.M., Parlak E., Kalkanci A., Sasmaz N. (2009) Systemic phaeohyphomycosis resembling primary sclerosing cholangitis caused by *Exophiala dermatitidis*. *J. Med. Microbiol.* 58(Pt9): 1243-1246.

Peña-Penabas C., Durán M.T., Yebra M.T., Rodriguez-Lozano J., Vieira V., Fonseca E. (2003) Chromomycosis due to *Exophiala jeanselmei* in a renal transplant recipient. *Eur. J. Dermatol.* 13(3): 305-307.

Peltroche-Llacsahuanga H., Schnitzler N., Jentsch S., Platz A., de Hoog S., Schweizer K.G., Haase G. (2003) Analyses of phagocytosis, evoked oxidative burst, and killing of black yeasts by human neutrophils: A tool for estimating their pathogenicity?. *Med. Mycol.* 41: 7-14.

Platz A. (2004) Flowzytometrische Erfassung der Phagozytose schwarzer Hefen durch humane Granulozyten. Dissertation. (GENERIC) Ref Type:Generic

Podbielski A., Schnitzler N., Beyhs P., Boyle M.D.P. (1996) M-related protein (mrp) contributes to group A streptococcal resistance of phagocytosis by human granulocytes. *Mol. Microbiol.* 19: 429-441.

Reiss N.R. and Mok W.Y. (1979) *Wangiella dermatitidis* isolated from bats in Manaus Brazil. *Sabouraudia* 17(3): 213-218.

Roos D. (1991) The involvement of oxygen radicals in microbicidal mechanisms of leukocytes and macrophages. *Klin. Wochenschr.* 69: 975-980.

Ross G.D., Cain J.A., Lachmann P.J. (1985) Membrane complement receptor type three (CR3) has lectin-like properties analogous to bovine conglutinin as functions as a receptor for zymosan and rabbit erythrocytes as well as a receptor for iC3b. *J. Immunol.* 134(5): 3307-3315.

Salih H., Husfeld L., Adam D. (1997) Inhibitory effect of heparin on neutrophil phagocytosis and burst production using a new whole-blood cytofluorometric method for determination. *Eur. J. Med. Res.* 2(12): 507-513.

Santos N.C., Igueira-Coelho J., Martins-Silva J., Saldanha C. (2003) Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide: pharmacological, cellular, and molecular aspects. *Biochem. Pharmacol.* 67(7): 1035-1041.

Schnitzler N., Haase G., Büssing A., Kaufhold A., Beyhs P., Podbielski A. (1995) Measuring resistance to phagocytosis of group A and G *streptococci*: comparison of direct bactericidal assay and flow cytometry. *Med. Microbiol. Immunol.* 184: 17-22.

Schnitzler N., Peltroche-Llacsahuanga H., Bestier N., Zündorf J., Lütticken R., Haase G. (1999) Effect of melanin and carotenoids of *Exophiala (Wangiella) dermatitidis* on phagocytosis, oxidative burst, and killing by human neutrophils. *Infect. Immun.* 67: 94-101.

Schwantes H.O. (1996) Biologie der Pilze ULMER, Stuttgart. S. 12 ff.

Schwarz N. and Berchtold B. (2006) Anorganische Pigmente. Institut für Anorganische Chemie, Universität Regensburg.

Sharma N.L., Mahajan V., Sharma R.C., Sharma A. (2002) Subcutaneous phaeohyphomycosis in India-a case report and review. *Int. J. Dermatol.* 41(1): 16-20.

Sixt M., Hallmann R., Wendler O., Scharffetter-Kochanek K., Sorokin, L.M. (2001) Cell adhesion and migration properties of beta 2-integrin negative polymorphonuclear granulocytes on defined extracellular matrix molecules. Relevance for leukocyte extravasation. *J. Biol. Chem.* 276: 1878-1887.

Stickle J.E. (1996) The neutrophil. Function, disorders, and testing. *Vet. Clin. North. Am. Small Anim. Pract.* 26: 1013-1021.

Sudhadham M., Prakitsin S., Sivichai S., Chaiyarat R., Dorrestein G.M., Menken S.B., de Hoog G.S. (2008) The neurotropic black yeast *Exophiala dermatitidis* has a possible origin in the tropical rain forest. *Stud. Mycol.* 61: 145-155.

Suh M.K. (2005) Phaeohyphomycosis in Korea. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi.* 46(2): 67-70.

Szaniszlo P.J., Karuppayil S.M., Mendoza L., Rennard R.J. (1993) Cell cycle regulation of polymorphism in *Wangiella dermatitidis*. *Arch. Med. Res.* 24: 251-261.

Thews G., Mutschler E., Vaupel P. (1999) Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen. 5. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, S.143 ff.

Tokuhisa Y., Hagiya Y., Hiruma M., Nishimura K. (2010) Phaeohyphomycosis of the face caused by *Exophiala oligosperma*. *Mycoses* 10: 1439-0507.

Tomson N., Abdullah A., Maheshwari M.B. (2006) Chromomycosis caused by *Exophiala spinifera*. *Clin. Exp. Dermatol.* 31(2): 239-241.

van Burik J.A. and Magee P.T. (2001) Aspects of fungal pathogenesis in humans. *Annu. Rev. Microbiol.* 55: 743-772.

Wang C., Hayashi H., Harrison R., Chiu B., Chan J.R., Ostergaard H.L., Inman R.D., Jongstra J. Cybulsky M.I., Jongstra-Bilen J. (2002) Modulation of Mac-1(CD11b/CD18)-mediated adhesion by the leukocyte-specific protein 1 is key to its role in neutrophil polarization and chemotaxis. *J. Immunol.* 169: 415-423.

Wolf A.M. (1992) Fungal diseases of the nasal cavity of the dog and cat. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 22(5): 1119-1132.

Zeng J.S., Sutton D.A., Fothergill A.W., Rinaldi M.G., Harrak M.J., de Hoog G.S. (2007) Spectrum of clinically relevant *Exophiala* species in the United States. *J. Clin. Microbiol.* 45(11): 3713-3720.

Zuther K., Mayser P., Hettwer U., Wu W., Spiteller P., Kindler B.L., Karlovsky P., Basse C.W., Schirawski J. (2008) The tryptophan aminotransferase Tam1 catalyses the single biosynthetic step for the tryptophan-dependent pigment synthesis in *Ustilago maydis*. *Mol. Microbiol.* 68: 152-172.

9 Danksagung

Hiermit möchte ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. P. Mayser für die Bereitstellung des Dissertationsthemas und die fachlich kompetente Betreuung bedanken. Den Labormitarbeitern der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie möchte ich für die netten Rahmenbedingungen dieser Arbeit danken, allen voran Frau Anne Gries, die mich stets mit ihrem fundierten technischen Wissen unterstützt hat.

Bei Herrn Dr. Dipl.-Chem. H. J. Krämer aus der Ethikkommission des Fachbereichs Medizin Gießen möchte ich mich herzlich für seine unermüdliche fachliche und menschliche Unterstützung bedanken, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Herrn Prof. Dr. Dr. G. Baljer und Herrn Dr. R. Weiß aus dem Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere Gießen möchte ich für die fachlich kompetente Betreuung und die sorgfältige Korrektur der vorliegenden Arbeit herzlich danken.

Ich danke Herrn Prof. Dr. R. Neiger für die schnelle Korrektur der Dissertationsschrift.

Dem Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin Gießen, insbesondere Herrn Dr. Hackstein, möchte ich für die Möglichkeit danken, die im Rahmen meiner Dissertation angefertigten Untersuchungen am Durchflusszytometer in dieser Abteilung durchführen zu dürfen. Für die tatkräftige Unterstützung und technische Hilfestellung möchte ich mich bei den Mitarbeitern des Laboratoriums, besonders bei Frau Gabriela Haley, bedanken, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand.

Vielen Dank an Herrn Prof. J. Geyer, Frau Dr. B. Döring und Frau Tierärztin S. Schmidt aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie FB Veterinärmedizin Gießen für deren Engagement bezüglich der Anfärbe- und Fotographieversuche dieser Arbeit am Fluoreszenzmikroskop.

Auch bei allen anderen, die mich vor allem moralisch unterstützt haben, möchte ich mich auf diesem Weg bedanken, insbesondere bei meiner tollen Familie, die immer an mich glaubt und mir alles ermöglicht hat.

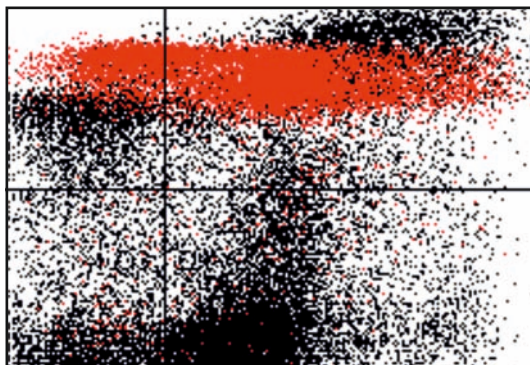
Dank gebührt meinem Mann Filip, der mir stets zur Seite steht und mich aus voller Kraft mit seinem Fachwissen, seiner Liebe und Kraft unterstützt hat.

10 Erklärung

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Johannisberg, den 19. Dezember 2011

Saskia Verena Kurz



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5967-5



9 78 3 835 19 59 67 5